

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Derivados de bis(benzimidazol) como nuevo vector
para el estudio de la interacción de carbohidratos
con el surco menor del ADN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego García Puentes

DIRECTORA

Cristina Vicent Laso

Madrid



UNIVERSIDAD COMPLUTENTE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Derivados de bis(benzimidazol) como nuevo vector para el estudio de la interacción de carbohidratos con el surco menor del ADN

Memoria que presenta

DIEGO GARCÍA PUENTES

Para optar al grado de
Doctor en Química Orgánica

Directora de la tesis: Dra. Cristina Vicent Laso



Instituto de Química Orgánica General - CSIC
Madrid 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Diego García Puentes,
estudiante en el Programa de Doctorado en Química Orgánica,
de la Facultad de Ciencias Químicas ☒ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Derivados de bis(benzimidazol) como nuevo vector para el estudio de la interacción de carbohidratos
con el surco menor del ADN

y dirigida por: Cristina Vicent Laso

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 5 ☒ de julio ☒ de 2019 ☒

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera dar las gracias a la Dra. Cristina Vicent por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por haber confiado en mí, aunque en ocasiones no se lo pusiera fácil. Tengo que agradecer especialmente la libertad que me ha dejado dentro del laboratorio, porque de los errores de uno mismo también se aprende. Y gracias sobre todo por haberse preocupado por mí durante todos estos años.

Quiero también dar las gracias a Javier Cañada por tanto como ha aportado a la realización de esta tesis. Toda la parte de RMN ha podido realizarse gracias a sus sabios consejos y a su dedicación, pasando largos ratos en el equipo optimizando experimentos y enseñándome a desenvolverme con esta técnica.

Del mismo modo quiero agradecer también a Jesús Jiménez Barbero todo el apoyo que ha dado a este proyecto y su contribución a los estudios estructurales que hemos realizado por RMN.

También me gustaría agradecer a Ángeles Canales todos los conocimientos que me ha transmitido sobre experimentos de RMN que no conocía, tanto en sus magníficas clases en la facultad, como en el laboratorio.

Si hay una persona a la que tengo que agradecer que esta tesis exista es a Andrea Taladriz, pues es quien me ha enseñado todo lo que hace falta para ser un buen científico. Otra cosa es que yo lo haya aprendido. Sin su apoyo, dedicación y paciencia seguramente no hubiese sido capaz de sacar esta tesis adelante, así que muchas gracias por todo.

Quiero dar las gracias también a mi tutora en la UCM, M^aÁngeles Herranz, por estar siempre pendiente de todos los plazos y trámites que hemos tenido que realizar (que no son pocos) y ser capaz de avisarme siempre a tiempo de todo. La burocracia no ha podido con nosotros.

Agradezco al Dr. Niklaas Buurma su contribución a este proyecto, tanto en la parte de diseño de ligandos como a los experimentos de microcalorimetría que ha realizado en su laboratorio junto con Andrea.

Agradezco a los compañeros del CIB (Carmen, Javier, Bea, Anita, Ioanna) el haberme recibido siempre como a uno más del laboratorio.

Quiero dar las gracias a los estudiantes que han pasado por el laboratorio, Andreu (realizando su TFM), Maruan y Gris por el trabajo que habéis aportado para esta tesis y por hacerme más amenos los días de síntesis en la vitrina.

Por supuesto, este trabajo tampoco habría salido adelante sin la ayuda del personal de los servicios del centro, tanto del IQOG como del CENQUIOR así que muchas gracias a Patrik (también por los buenos ratos), Mariajo (sigues ayudando incluso aunque ya no siga en el centro), Elisa, Maite, May, Pablo, Manuela, Mercedes, Julián, Belén, Guada... También dar la gracias al personal de secretaría y gerencia por ayudarnos con todos los temas burocráticos, sin duda la peor parte de la investigación: Fermín, Belén, Estrella, Isabel, Concha.

Del mismo modo también agradecer al servicio técnico del ICTP por el uso del fluorímetro.

También quiero agradecer a los han sido mis compañeros y vecinos de laboratorio durante todos estos años por hacer que mereciese la pena ir a trabajar: Raúl (por tu buen rollo e infinita sabiduría), Alberto (por esas guerras musicales), Gabriela (por tener siempre una sonrisa, aun moliendo trigo), Quique, Larisa, Delia, David, Ester, Maite, Elma, Jose, Gema, Jaime... mucha gente ha pasado por estas cuatro paredes.

Muchas gracias también a todos los compañeros de pasillo que siempre habéis estado ahí, tanto para temas científicos como para esas largas charlas quejándonos un poco de todo: María Frutos (¿cuántas veces hemos arreglado el mundo?), Marta (pero si tú eras de inorgánica...), Isra (los consejos más prácticos sin duda), Guille (tu sabiduría y optimismo hacían que el instituto funcionase), Laura, Ester...

En la planta de abajo también tengo que agradecer a la gente de analítica los buenos ratos que hemos pasado: María Jesús (gracias por haber estado ahí siempre para aguantar mis historias), Andrea (ese positivismo que se te contagiaba), Cripri (ese vino tuyo era de 10, pero mi hidromiel estaba mejor).

No se me puede olvidar dar las gracias a la gente de Química Médica: Paco (tenemos muchas cañas pendientes aún), Ana, Gracia, Natalia, Paula, Martin, Clara, Diego...

Quiero dar las gracias también a los compañeros del máster Alejandra, María, Ana, Paquillo, Nerea... Cuánto hemos sufrido junto, pero que bien lo hemos pasado.

Por supuesto a mis compañeros de carrera, que han resultado ser de los mejores amigos que he podido encontrarme en la vida. María Jesús (esos largos paseos hacia ningún sitio en concreto), Gong, Alicia, Rober, Alberto, Jaime, Sara...

Muchas gracias especialmente a Jorge y Yoni por rescatarme de vez en cuando para ir a hacer lo que sea, desde una cena a un viaje loco por Rumania. Seguramente esos momentos me hayan salvado la vida.

Gracias también a mi hermano Daniel, aunque seas el pequeño eres todo un ejemplo a seguir, por tu perseverancia al seguir luchando sin rendirse para conseguir el futuro que te mereces. Gracias por tantos buenos ratos como hemos pasado y seguiremos pasando. Cuando quieras nos seguimos pegando.

Y por supuesto, gracias a las personas sin las cuales estaría yo aquí: mis padres. Gracias por todos los sacrificios que habéis hecho a lo largo de nuestra vida para poder darnos una buena educación, por ello he sido capaz de llegar hasta aquí. Gracias por todo vuestro cariño, sé que todas las broncas han sido por nuestro bien (y han sido merecidas). Y no dejéis nunca de ser tan pesados.

Gracias a todos vosotros.

REVIATURAS	1
RESUMEN	5
SUMMARY	13
1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	20
1.1. Relevancia del papel del carbohidrato en procesos de reconocimiento molecular	23
1.1.1. Propiedades del ADN: estructura y reconocimiento molecular	25
1.1.2. El carbohidrato en procesos de reconocimiento molecular	28
1.1.2.1. Interacciones CH - π	29
1.1.2.2. Enlace de hidrógeno y cooperatividad	30
1.1.3. Papel del carbohidrato en ligandos del ADN	31
1.2. Antecedentes	34
1.2.1. Vector derivado de oligoamida heteroaromática neutra	37
1.2.2. Vector derivado de oligoamida heteroaromática catiónica	39
1.3. Diseño de un nuevo vector derivado de bis(benzimidazol)	41
1.4. Objetivos	43
2. CAPÍTULO 2: DISEÑO Y PROPIEDADES DE LIGANDOS GLICOSILADOS CON VECTOR DERIVADO DE BIS(BENZIMIDAZOL)	49
2.1. Diseño de derivados glicosilados del vector de bis(benzimidazol)	51
2.2. Propiedades en estado libre en medio acuoso: agregación	53
2.2.1. Estudio de la agregación por UV y CD	53
2.2.2. Estudio de la agregación por RMN	58
2.2.3. Estudios preliminares de agregación por ITC	61
2.3. Estudios de interacción por dicroísmo circular	63
2.3.1. Experimentos de valoración con los oligonucleótidos A ₂ T ₂ , A ₃ T ₃ y R13	65

2.3.2. Estequiometría de los complejos con los oligonucleótidos A ₂ T ₂ , A ₃ T ₃ y R13	68
2.3.3. Cálculo de las constantes de asociación de los complejos formados con A ₂ T ₂ , A ₃ T ₃ y R13	69
2.4. Estudios de interacción por RMN: STD	75
2.5. Conclusiones	80
3. CAPÍTULO 3: DISEÑO Y PROPIEDADES DE LIGANDOS GLICOSILADOS CON VECTOR DERIVADO DE BIS(BENZIMIDAZOL) Y ESPACIADOR DE β-ALANINA	81
3.1. Propuesta de nuevo diseño: espaciador de β-Alanina	83
3.2. Propiedades en estado libre en medio acuoso: agregación	85
3.2.1. Estudio de la agregación por UV y CD	85
3.2.2. Estudio de la agregación por RMN	87
3.3. Comparación de la interacción por CD entre las dos familias de derivados con el oligonucleótido A ₂ T ₂	89
3.4. Comparación de la interacción por STD entre las dos familias de derivados	90
3.5. Cuantificación de la interacción de los derivados de bis(benzimidazol)-β-Ala con oligonucleótidos de ADN	93
3.5.1. Experimentos de interacción (valoraciones por CD)	94
3.5.1.1. Valoraciones con los oligonucleótidos A ₂ T ₂ y A ₃ T ₃	95
3.5.1.2. Valoraciones con el oligonucleótido R13	96
3.5.1.3. Estequiometría de los complejos: <i>Job Plots</i>	97
3.5.2. Cálculo de las constantes de asociación (K _a) y energía libre de Gibbs (ΔG) para los complejos con A ₂ T ₂ y A ₃ T ₃	99
3.5.2.1. Comparación de la estabilidad de los complejos formados con respecto al Hoechst 33258 en su interacción con A ₂ T ₂ y A ₃ T ₃	102
3.5.2.2. Contribución del carbohidrato a la estabilidad de los complejos con A ₂ T ₂ y A ₃ T ₃	103

3.5.2.3. Influencia de la quiralidad del carbohidrato en su contribución a la estabilidad de los complejos con A ₂ T ₂ y A ₃ T ₃	104
3.5.2.4. Evaluación de la posible contribución de la cooperatividad de enlace de hidrógeno en β-D-Manosa con A ₂ T ₂	105
3.6. Conclusiones	106
4. CAPÍTULO 4: ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON OLIGONUCLEÓTIDOS DE ADN POR RMN	109
4.1. Introducción	111
4.2. Asignación del complejo formado por bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Man (9) con A ₂ T ₂	116
4.3. Asignación del complejo formado por el ligando bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Man- ¹³ C ₆ (10) con A ₂ T ₂	122
4.4. Conclusiones	132
5. CAPÍTULO 5: SÍNTESIS DE LIGANDOS DEL SURCO MENOR DEL ADN	133
5.1. Introducción	135
5.2. Síntesis de los ácidos del vector de bis(benzimidazol) y del vector con espaciador de β-Alanina (15 y 17)	139
5.3. Síntesis de glicosilaminas (19a-e)	144
5.4. Formación del enlace amida vector (15 , 17) - carbohidrato (20a - e) y desprotecciones finales	147
5.5. Conclusiones	153
6. CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES	155
PARTE EXPERIMENTAL	161
BIBLIOGRAFÍA	209
ANEXO	219

A	Adenina
ADN / DNA	ácido desoxirribonucleico/ deoxyribonucleic acid
Ac	acetilo
Ala	Alanina
Ar	arilo, protones aromáticos
ax.	axial
API-ES	atmospheric pressure ionization electrospray
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
bp	pares de bases, base pair
C	Citosina
°C	grados Celcius (centígrados)
calc	calculado
CD	Circular Dichroism/Dicroísmo circular
COSY	Correlated Spectroscopy
<i>ct</i> -DNA	calf thymus DNA
Cy	ciclohexilo
d (NMR)	doblete
DCM	diclorometano
dd (NMR)	doblete de dobletes
DF-STD	Differential-Frequency Saturation Transfer Difference
DIPEA	diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
ec.	ecuatorial
EH	enlace de hidrógeno
E.M.	espectrometría de masas
equiv.	equivalente
ESI	electrospray ionization

Et	etilo
G	guanina
Glc	Glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -Acetil-D-glucosamina
h	horas
HBTU	(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato)
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
ICD	Induced Circular Dichroism / Dicroísmo Circular Inducido
Im	imidazol
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
IR	espectroscopía de infrarrojo
M	molar
Man	Manosa
Me	metil
min	minutos
M. W	microwaves
nOe	efecto nuclear Overhauser
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
MOPS	ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfónico
MS	mass spectrometry (espectrometría de masas)
m/z	relación masa / carga
Ph	fenilo
Pf	Punto de fusión
ppm	partes por millón
py	piridina

rto.	rendimiento
RF	retention factor (factor de retención)
RMN	resonancia magnética nuclear
s (RMN)	singlete
sa (RMN)	singlete ancho
STD	Saturation Transfer Difference
t (RMN)	Triplete
T	temperatura
t.a.	temperatura ambiente
THF	tetrahidrofurano
TFA	ácido trifluoroacético
TFE	trifluoroetanol
TMSCI	trimetilclorosilano
TLC	Cromatografía en capa fina
Tm	Tiempo de mezcla/mixing time
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
tr-NOESY	transfer NOESY
TSP	ácido trimetilsilil propanoico
UV/Vis	ultravioleta/visible
¹ H-RMN	resonancia magnética nuclear de protón
¹³ C-RMN	resonancia magnética nuclear de carbono 13
¹⁹ F-RMN	resonancia magnética nuclear de flúor 19

Resumen

Derivados de bis(benzimidazol) como nuevo vector para el estudio de la interacción de carbohidratos con el surco menor del ADN

El objetivo general de la presente tesis es poder cuantificar la contribución a la interacción de los carbohidratos con el interior del surco menor del ADN. Para ello, el primer objetivo es el diseño de un nuevo tipo de vector que acerque al carbohidrato hasta el surco menor del ADN.

En este contexto, los ligandos de la familia Hoechst se ajustan a nuestro objetivo debido a que su interacción con el surco menor del ADN es bien conocida, presentando una elevada afinidad de secuencias AT y, además, el proceso de agregación que presentan ha sido estudiado y cuantificado por técnicas de microcalorimetría. Por otro lado, los trabajos de Nielsen y Jacobsen presentan un análogo de Hoechst con un grupo ácido en un extremo, lo que posibilita la formación de enlaces amida (Figura 1). Dicha estructura es ideal para nuestros objetivos.

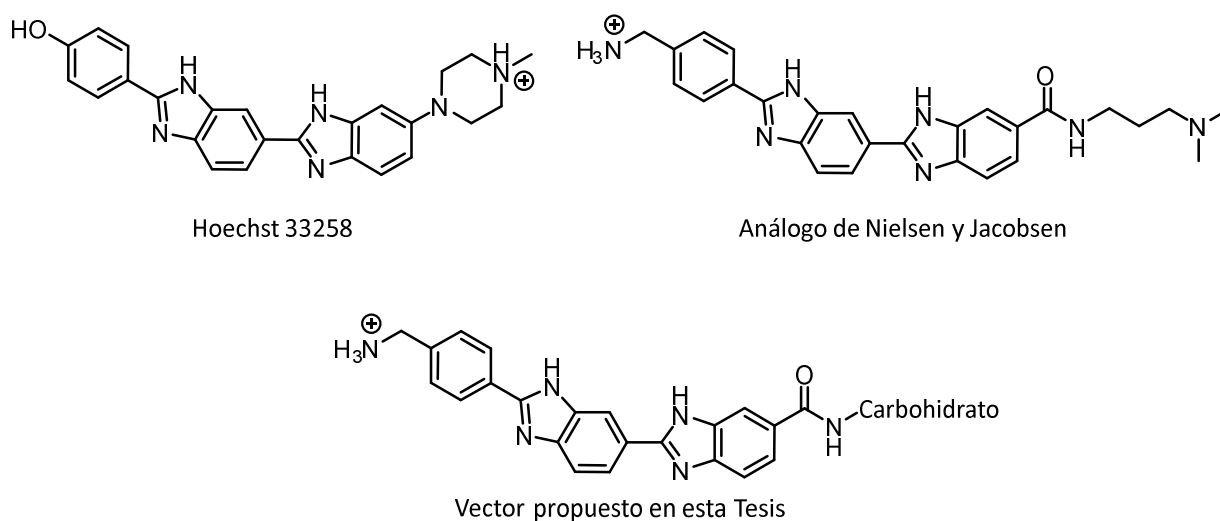


Figura 1 Vector propuesto para esta Tesis y estructuras en las que se basa

Por ello se ha sintetizado inicialmente una familia de derivados glicosilados en los que los carbohidratos se unen directamente a este núcleo de bis(benzimidazol) mediante un enlace amida (Figura 2). Los compuestos se obtuvieron con un rendimiento global del 14% en 8 etapas.

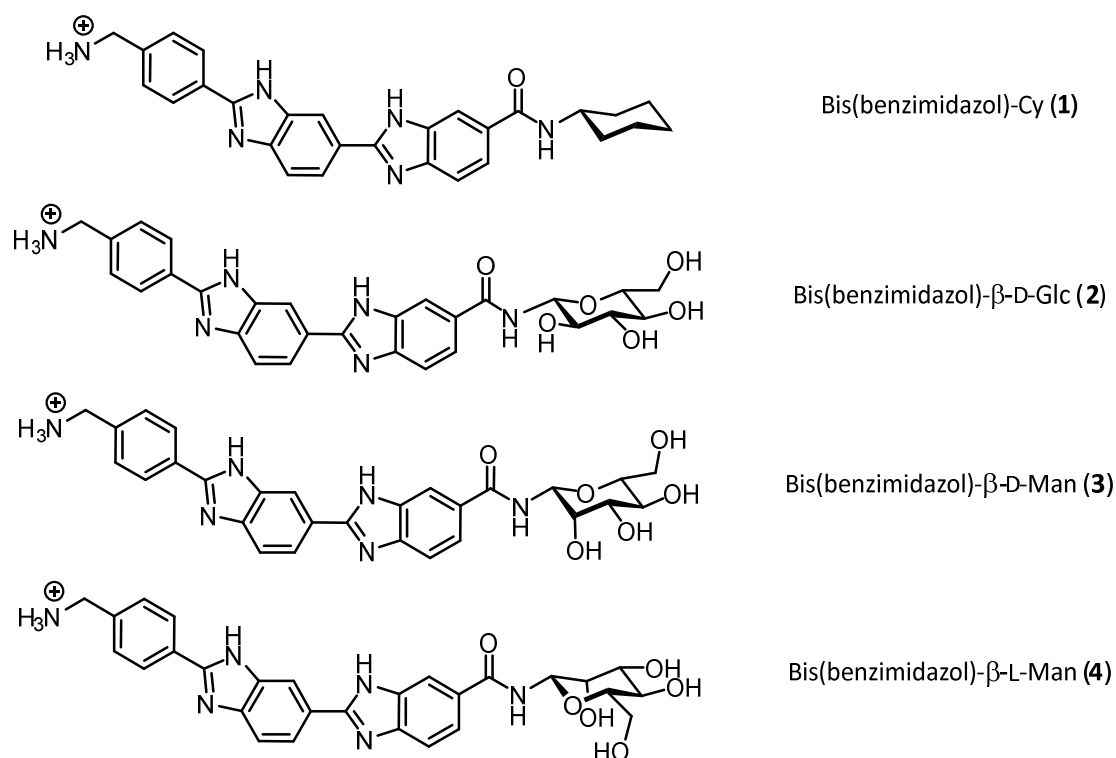


Figura 2 Moléculas objetivo de la tesis

Una vez sintetizada esta primera familia de derivados (**1 - 4**), se llevó a cabo el estudio de sus propiedades en disolución acuosa, con especial interés en los procesos de auto-asociación que puedan presentar. Los experimentos de dilución realizados por Dicroísmo Circular (CD), muestran la aparición de una banda de DC de doble signo, indicando claramente un proceso de auto-asociación cuyo estudio detallado demostró que se trata de un proceso isodésmico. Además, la existencia del proceso de auto-asociación se pudo corroborar por técnicas de RMN (DOSY).

El siguiente objetivo de la presente tesis es el estudio de la interacción de los ligandos **1 - 4** con oligonucleótidos de cadena corta. Hemos seleccionado las secuencias 5'-CGCGAATTCGCG-3' y 5'-CGCAAATTTGCG-3' (A_2T_2 y A_3T_3) cuya zona central contiene la secuencia AATT, selectiva de los derivados de bis(benzimidazoles). Para el estudio de la interacción se realizaron valoraciones por CD de todos los ligandos con todas las secuencias. Tanto la intensidad de la banda inducida de CD como el hecho de que las constantes de asociación medidas para los complejos con distintos carbohidratos son muy similares, sugirió que los ligandos no entran lo suficiente en el surco menor. Esta teoría pudo corroborarse mediante experimentos de STD, viendo que hay una baja transferencia de saturación al carbohidrato en complejos con *ct*-DNA.

Para solucionar dicho problema, fue necesario modificar la estructura del vector. Se decidió introducir un espaciador entre el vector y el carbohidrato para permitir al azúcar cierto grado de libertad, tanto de movimiento como de orientación, con el fin de ejercer su interacción con el surco menor del ADN. Por ello, se seleccionó β -Alanina como espaciador entre el vector aromático y el carbohidrato y se sintetizó una segunda familia de derivados. Los compuestos se obtuvieron con un rendimiento global del 12% en 10 etapas.

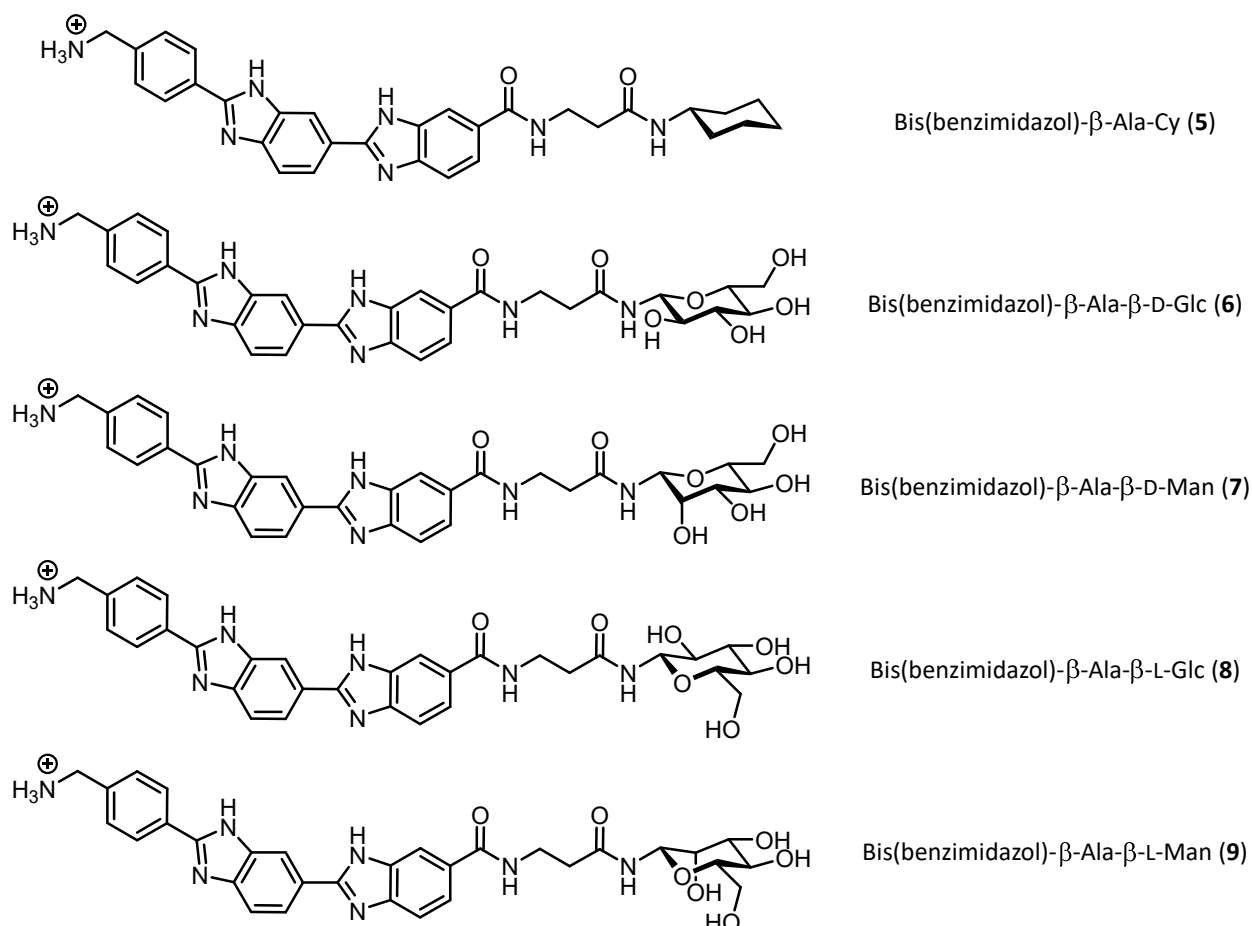


Figura 3 Nueva generación de derivados preparada

Los estudios de interacción por dicroísmo circular de estos nuevos ligandos (**5 - 9**) con los oligonucleótidos mencionados anteriormente, muestran un incremento del dicroísmo circular molar ($\Delta\epsilon$) unas 4 veces mayor que el de los derivados anteriores (**1 - 4**) (Figura 4). Este es un resultado muy importante que indica claramente que los ligandos se introducen adecuadamente en el interior del surco menor del ADN de estas secuencias de oligonucleótidos.

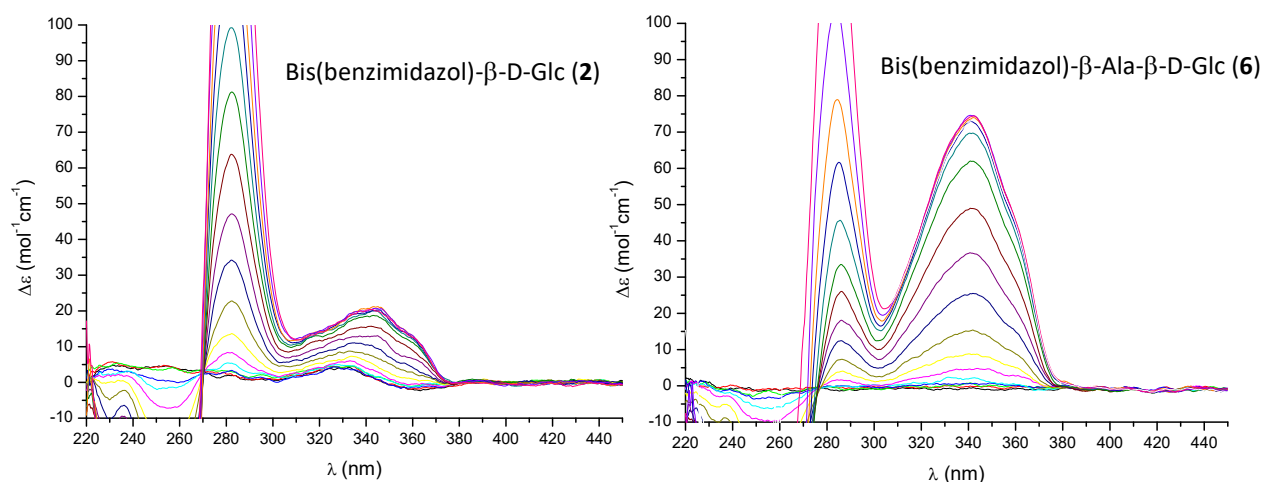


Figura 4 Valoración por DC de ambos derivados de β -D-Glc (**2** y **6**) con el dodecámero A_2T_2

Para corroborar que el carbohidrato se encuentra en el interior del surco menor del ADN, se realizaron experimentos de STD entre estos ligandos y un polímero de ADN (*ct*-DNA). Como se observa en la Figura 5, la transferencia de saturación al carbohidrato es elevada, indicando que, efectivamente, se ha alcanzado el objetivo buscado. El azúcar se encuentra en el interior del surco menor del ADN.

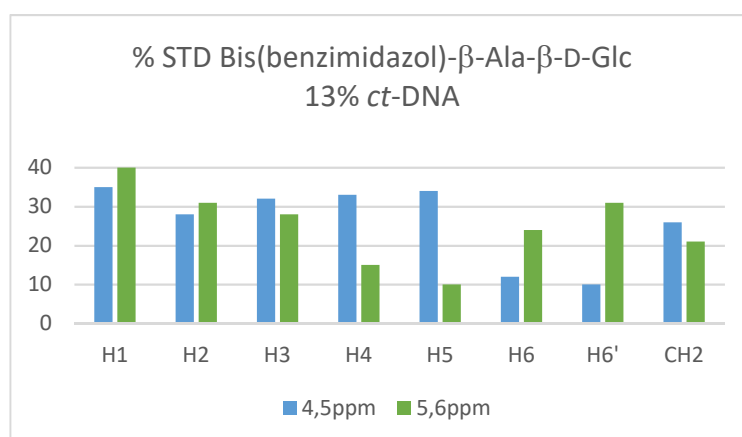


Figura 5 Porcentaje de STD obtenido para cada protón del carbohidrato a distintas frecuencias de irradiación

El hecho de que el carbohidrato llegue hasta el interior del surco menor permite que éste pueda establecer su interacción con los dadores y aceptores de enlace de hidrógeno de las bases nitrogenadas del ADN. De este modo, los distintos carbohidratos interaccionarían de distinto modo con una misma secuencia de ADN. Dicho comportamiento se observa en experimentos de valoración realizados por CD, presentando constantes de afinidad comprendidas entre $7 - 41 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Además, los derivados con carbohidratos de la serie L presentan mejores constantes de afinidad que el propio Hoechst 33258 para estas secuencias.

Mediante estos experimentos, se ha logrado cuantificar por primera vez la contribución del carbohidrato a la interacción con el surco menor del ADN. Además, el derivado que presenta una menor afinidad por el ADN es el derivado de ciclohexilo (**5**), indicando que el carbohidrato presenta una contribución favorable a la interacción con el ADN, llegando a alcanzar las 2.0 Kcal/mol de diferencia en el caso más favorable (derivado de β -L-Glc). Por otro lado, el efecto de la quiralidad del carbohidrato también ha sido cuantificado. Los derivados que cuentan con carbohidratos de la serie L (**8** y **9**) presentan una mayor afinidad que sus homólogos de la serie D (**6** y **7**) en todos los casos, llegando a las 0.9 Kcal/mol de diferencia entre los derivados de β -Glc (**6** y **8**).

Cabe destacar, además, que se han encontrado diferencias en la interacción de los derivados de β -D-Man y β -D-Glc (**6** y **7**) en su interacción con secuencias A_2T_2 y A_3T_3 . Para la secuencia A_3T_3 la afinidad de β -D-Glc es mayor que la de β -D-Man, mientras que para la secuencia A_2T_2 ocurre lo contrario: la afinidad de β -D-Man es mayor que la de β -D-Glc en 0.3 Kcal/mol, lo que podría suponer en este caso específico un aporte de la cooperatividad de enlace de hidrógeno a la estabilidad del complejo.

En este punto del trabajo, es necesario realizar un estudio estructural en profundidad de los complejos formados, con el objetivo de conocer el sitio de unión de los ligandos glicosilados. Nuestro interés se centra especialmente en el carbohidrato, pues deseamos conocer los centros específicos con los que interacciona o si se pone en juego la cooperatividad de EH en la interacción de los derivados de Manosa. Por ello, se elucidó estructuralmente el complejo formado entre el derivado de β -L-Man (**9**), y el dodecámero A_2T_2 mediante técnicas bidimensionales de RMN.

Los resultados de estos experimentos lograron determinar el sitio de interacción del ligando. Así, el vector ocupa las bases AATT (Figura 6), tal como lo hacen el Hoechst 33258 y el compuesto del Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen. Sin embargo, no se pudo establecer el sitio de interacción del carbohidrato, debido al solapamiento entre las resonancias de la Manosa y las de las desoxirribosas del oligonucleótido.

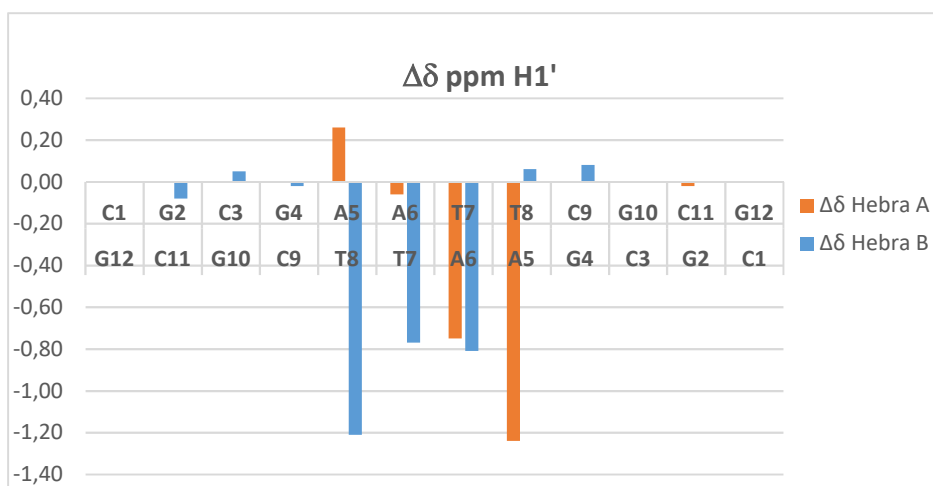


Figura 6 Desplazamiento de las resonancias del protón H1' de las desoxirribosas del dodecámero A₂T₂ al formar el complejo con bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Man

Para solventar dicho problema, se sintetizó el ligando bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Man-¹³C₆ (**10**) y se realizó nuevamente la elucidación estructural por RMN del complejo con A₂T₂. De esta manera se llevaron a cabo experimentos de RMN bidimensionales (¹H, ¹³C-HSQC-NOESY) y tridimensionales (3D NOESY-HSQC), siendo la primera vez que se hace uso de estos experimentos para el estudio de la interacción carbohidrato - ADN. En ellos, se observaron diferentes nOes entre el carbohidrato y el protón H1' de la desoxirribosa A5 del oligómero, confirmando su proximidad al interior del surco y aportando información sobre su sitio de interacción. Con estos datos se confirma que el carbohidrato ocupa unos tres pares de bases del ADN a continuación del sitio de unión del vector (Figura 7).

Ambos ligandos enantiómeros derivados de β-Manosa (**9** y **10**) se disponen de la misma manera en el complejo formado con el oligonucleótido A₂T₂, por tanto, podemos afirmar que las diferencias observadas en las constantes de afinidad medidas por CD se deben exclusivamente a interacciones específicas de los carbohidratos β-D-Man y β-L-Man con las bases del oligonucleótido.

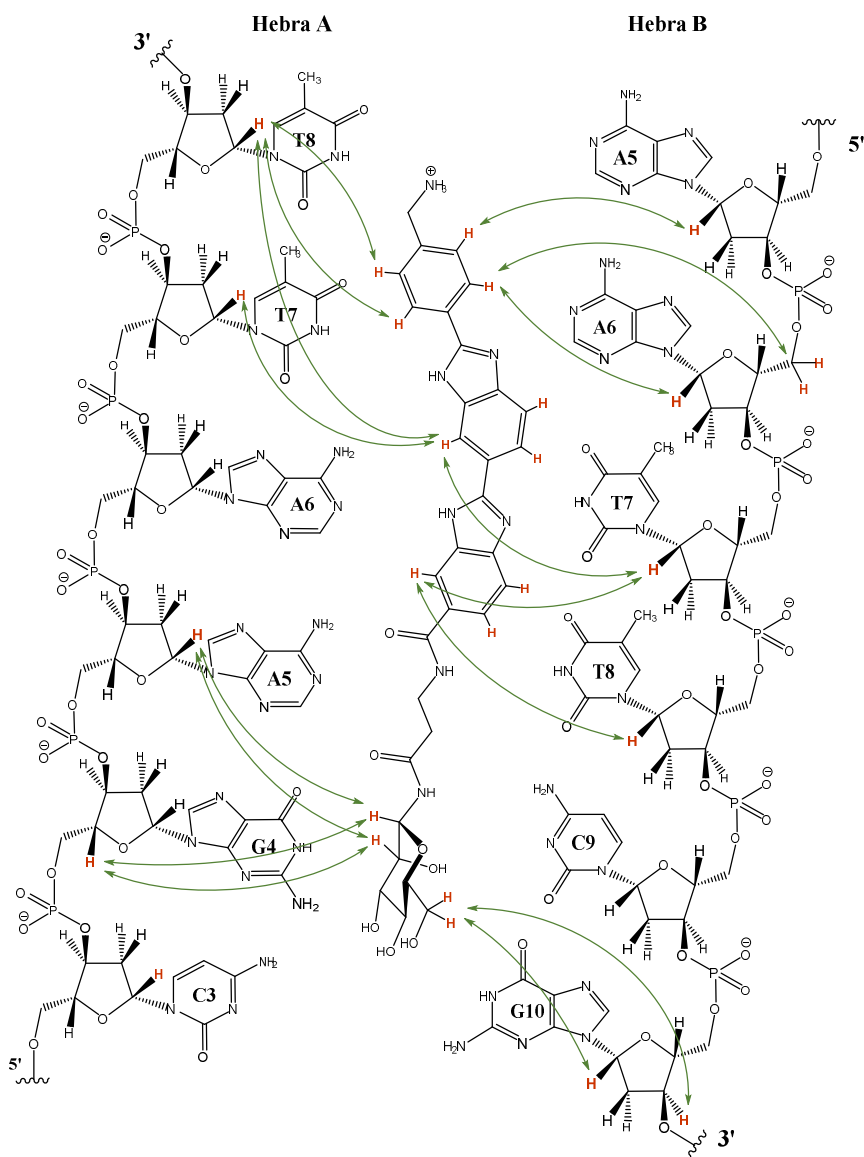


Figura 7 nOes observados entre bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man y el dodecámero A₂T₂

Es muy interesante destacar que los experimentos 3D NOESY-HSQC y ^1H , ^{13}C -HSQC-NOESY con el derivado de β -D-Man (**10**) y A₂T₂ mostraron que sus centros 1 y 2 (involucrados en la cooperatividad de enlace de hidrógeno) están orientados hacia el interior del suco menor y están próximos espacialmente a la Adenina A5-A (que cuenta con aceptores de enlace de hidrógeno).

Teniendo en cuenta esta información estructural y los datos de estabilidad obtenidos por CD para los dos complejos β -D-Glucosa (**6**) y β -D-Manosa (**7**), es muy posible que la contribución extra de 0.3 Kcal/mol a la estabilización del complejo con A₂T₂ en favor de la Manosa sea debida a la presencia de un enlace de hidrógeno cooperativo que involucre al hidroxilo 2 de la Manosa y la adenina A5-A en esta secuencia de ADN.

Summary

Bis(benzimidazole) derivatives as new vector to study the carbohydrate interaction with the DNA minor groove.

The main objective of this PhD thesis is to quantify the carbohydrate contribution to the interaction with the DNA minor groove. To achieve this, the first objective is designing a new vector type molecule able to carry the carbohydrates into the inner region of the DNA minor groove.

On this contest, Hoechst ligands fit to our objective due to the fact that their interaction with the DNA minor groove is well known, showing a high AT sequences affinity and, additionally, their aggregation process has been studied and quantify by microcalorimetry. On the other hand, Nielsen and Jacobsen reported a Hoechst analogue whose structure contains an acid group at a terminal position, allowing the formation of an amide bond (Figure 1) between the vector and the sugar. This structure is excellent for our objectives.

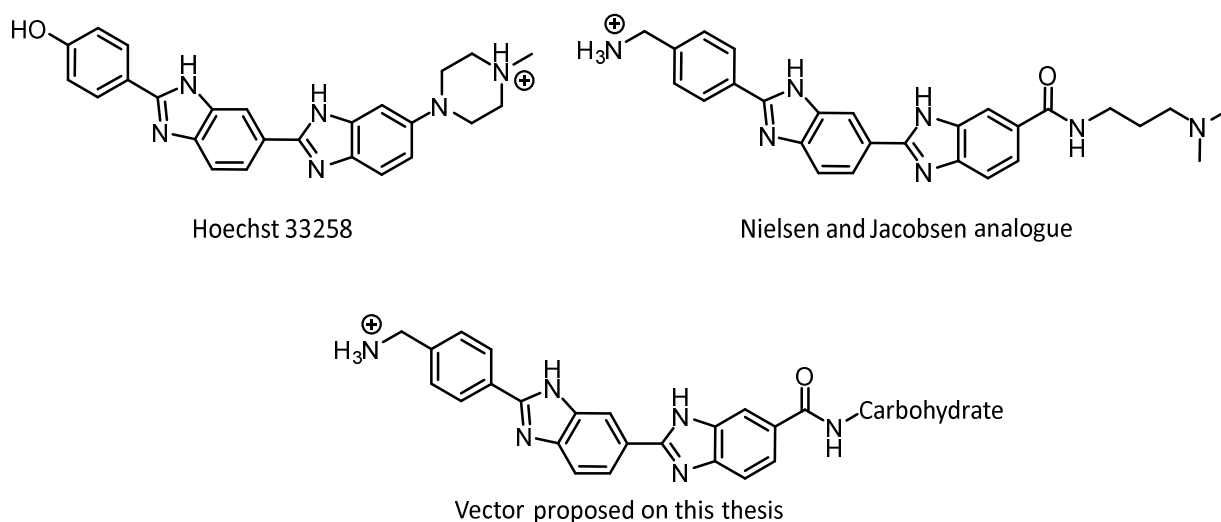


Figure 1 Vector proposed on this thesis

Thus, in this thesis we initially synthesized a family of glycosylated derivatives whose carbohydrates are linked directly to the bis(benzimidazole) core by an amide bond (Figure 2). The overall yield of the synthesis is 14% in 8 steps.

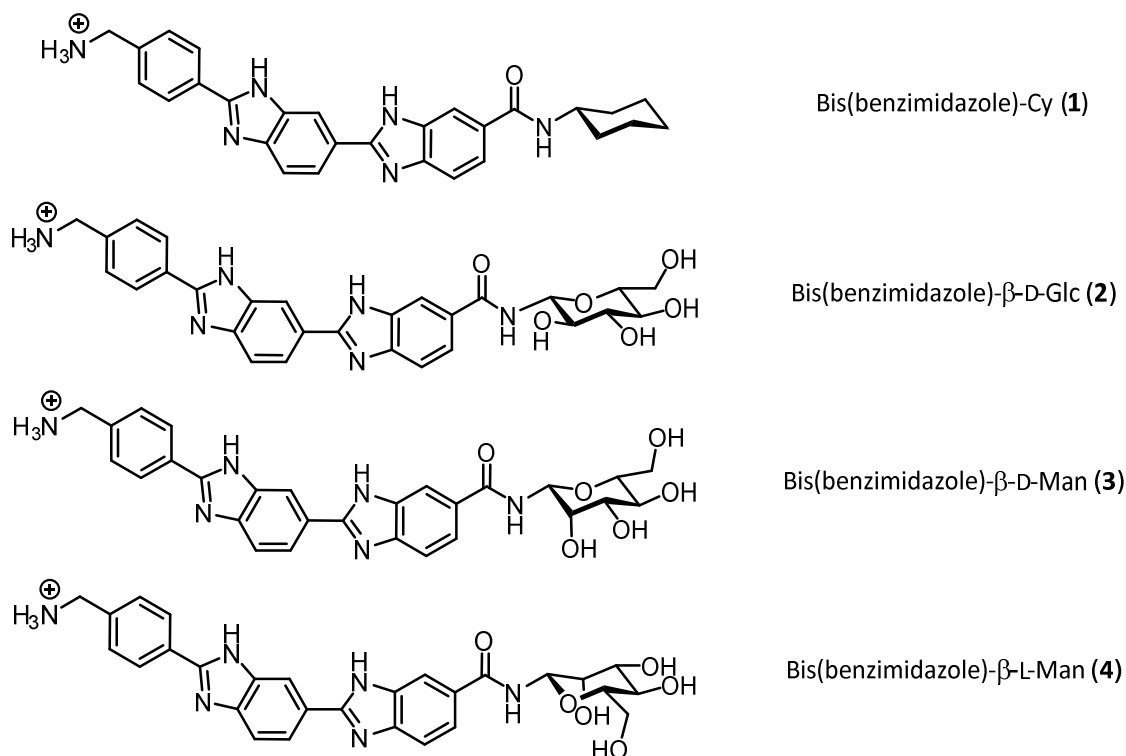


Figure 2 Target molecules of this thesis

Once this first family of water soluble derivatives (**1 - 4**) was synthesized, the study of their properties in aqueous solution was performed, with special interest in the self-assembly process they may present. Dilution experiments done by circular dichroism (CD) show the formation of a bisignate CD band, indicating the presence of a self-assembly process, whose detailed study demonstrated to be an isodesmic process. In addition, the self-assembly process could be characterized by NMR experiments (DOSY).

The next objective of this thesis is to study the ligand (**1 - 4**) interaction with short strand oligonucleotides with 5'-CGCGAATTCGCG-3' y 5'-CGCAAATTTGCG-3' sequences (A₂T₂ y A₃T₃) whose central section contains the AATT sequence, selective of bis(benzimidazole) derivatives. To study the interaction, we carried out CD titrations with all ligands and sequences. The CD induced band intensity and the fact that the different carbohydrates interaction *K_a* obtained were very similar, showed that the ligands do not reach the DNA minor groove inner region. This hypothesis was confirmed with STD experiments, showing a low saturation transfer to the carbohydrate resonances in the complexes with *ct*-DNA.

In order to solve this problem, it was necessary to modify the vector molecule structure. We decided to introduce a linker between the aromatic vector and the

carbohydrate to allow a certain degree of movement and orientation freedom to the sugar to promote DNA interaction with the inner region of the minor groove. Therefore, we selected β -Alanine as the linker and then a second family of derivatives (**5 - 9**) was prepared (Figure 3). The synthesis was performed with an overall yield of 12% in 10 steps. They are all water soluble.

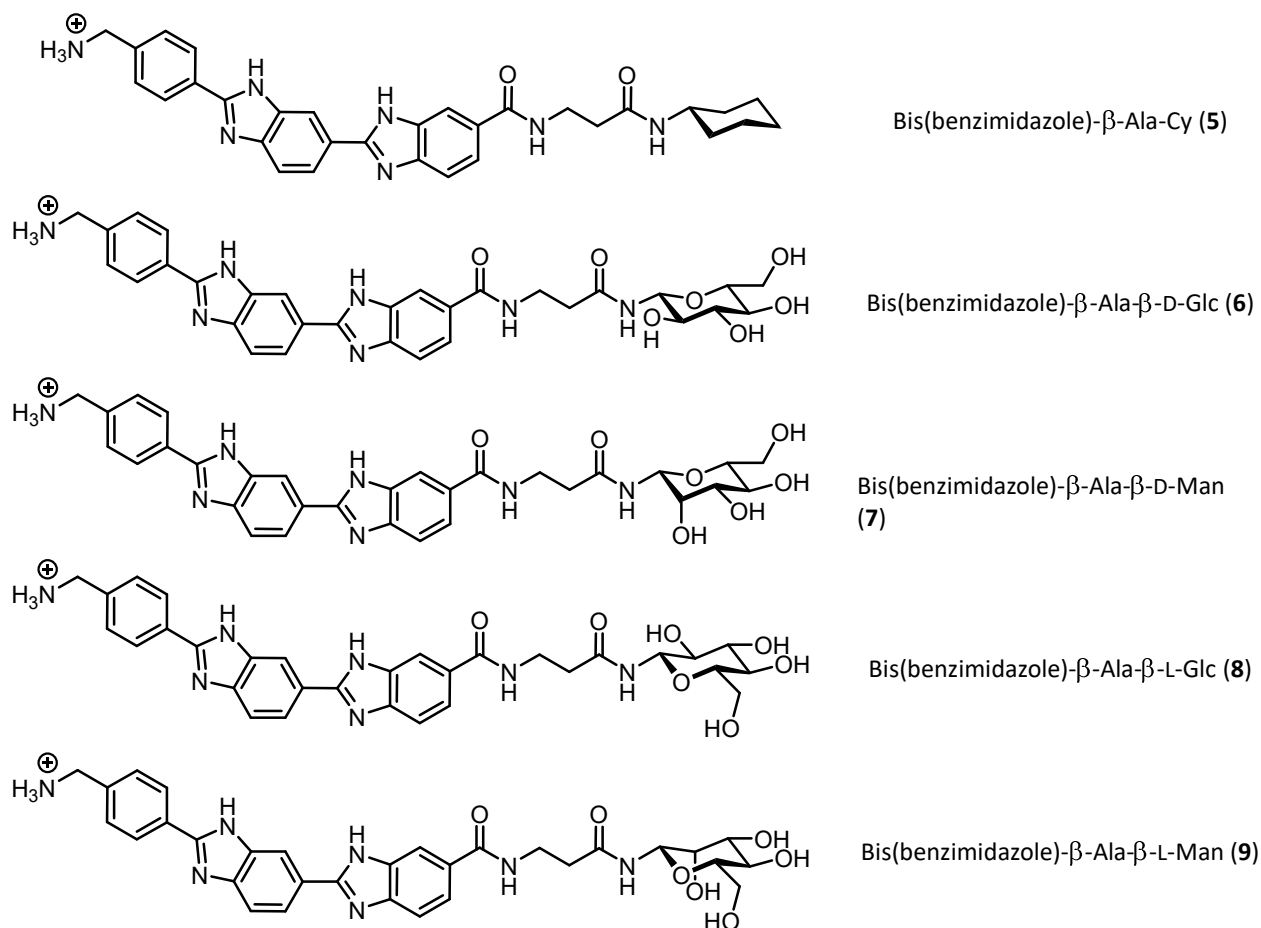


Figure 3 New derivative generation prepared

The CD interaction studies of these new ligands (**5 - 9**) with the previously mentioned oligonucleotides, showed a molar circular dichroism increase ($\Delta\epsilon$) 4 times higher than the previous derivatives (**1 - 4**) (Figure 4). This important result clearly indicates that these new ligands are penetrating well into the minor groove inner region.

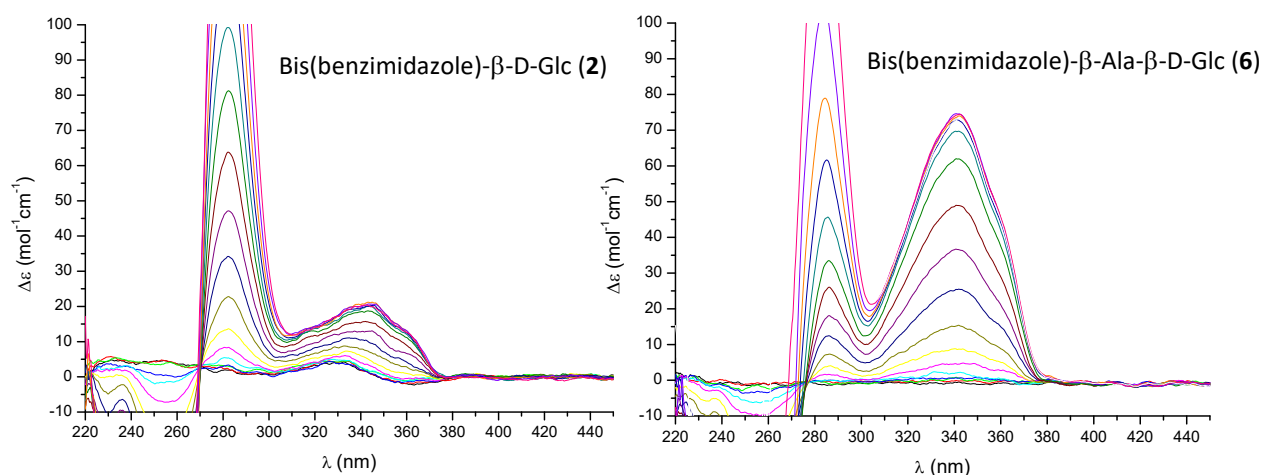


Figure 4 CD titration experiments of both β -D-Glc (**2**, **6**) derivatives with A_2T_2 dodecamer

In order to confirm that the carbohydrate is into the DNA minor groove, a STD experiment was carried out between bis(benzimidazole)- β -Ala complexes and a DNA polymer (*ct*-DNA). As Figure 5 shows, the saturation transfer to the carbohydrate resonances is very high, indicating that we achieved our objective. The sugar is into the minor groove of the DNA.

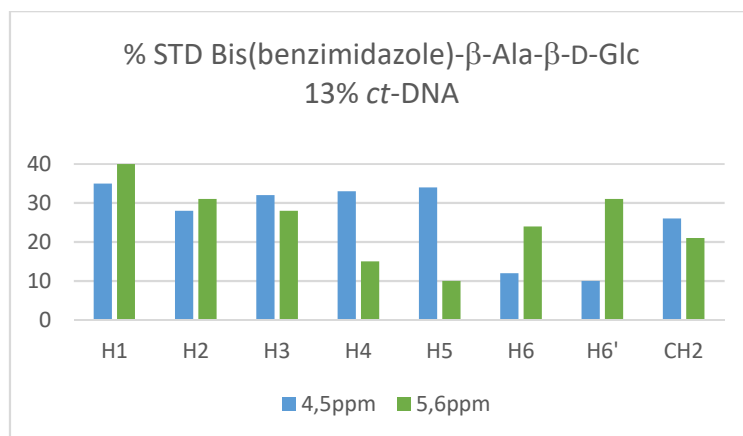


Figure 5 STD obtained to each carbohydrate proton at different irradiation frequencies

The fact that the carbohydrates reach the minor groove inner region allow them to establish their interaction with the DNA donor and acceptor hydrogen bond centres. In this way, the different carbohydrates may interact in a different way with different DNA sequences. This behaviour is observed in the titration experiments done by CD, showing affinity constants between $7 - 41 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. In addition, the carbohydrates of L series present better affinity constants than Hoechst 33258 to these sequences.

These experiments allow us to quantify for first time the carbohydrate contribution to the DNA minor groove interaction. In addition, the cyclohexyl derivative (**5**) showed the lowest DNA affinity, indicating that the OH groups of the sugar should play a role in complexation. Thus, the carbohydrate has a favourable contribution to the DNA interaction reaching a difference of 2.0 Kcal/mol in the case of the β -L-Glc (**8**) derivative. On the other hand, the difference in chirality of D and L-sugars was also quantified. The conclusion is that the L series derivatives (**8** and **9**) showed a greater affinity than the D series enantiomer (**6** and **7**) in all cases, with a difference of 0.9 Kcal/mol between Glucose derivatives (**6** and **8**).

It should be noted that we found some differences in the interaction of β -D-Man and β -D-Glc derivatives with A_2T_2 y A_3T_3 sequences. The β -D-Glc (**6**) affinity to the A_3T_3 sequence is higher than the β -D-Man (**7**) affinity. However, regarding the A_2T_2 sequence, we found the opposite situation: the β -D-Man affinity is higher than the β -D-Glc affinity in 0.3 Kcal/mol. This may be due to an extra contribution of a hydrogen bonding cooperativity process.

At this point, it is necessary to perform a structural study of the complexes formed, in order to establish the interaction site of the glycosylated ligands. Our aim is focused on the carbohydrate, because we want to know the specific OH carbohydrate centres which interacts with the particular base pairs of the DNA. Thus, we select the complex formed between the β -L-Man derivative (**9**) and the A_2T_2 dodecamer to be studied and characterized by 2D NMR techniques.

The result of these experiments allowed us to unequivocally determine the ligand interaction site. The aromatic part of the vector is placed at the AATT bases (Figure 6), in the same way as Hoechst 33258 and Nielsen and Jacobsen derivatives do. Unfortunately, the carbohydrate interaction site was not able to be determined due to an overlapping between the resonances of manose in the ligand and the deoxyriboses resonances of the DNA.

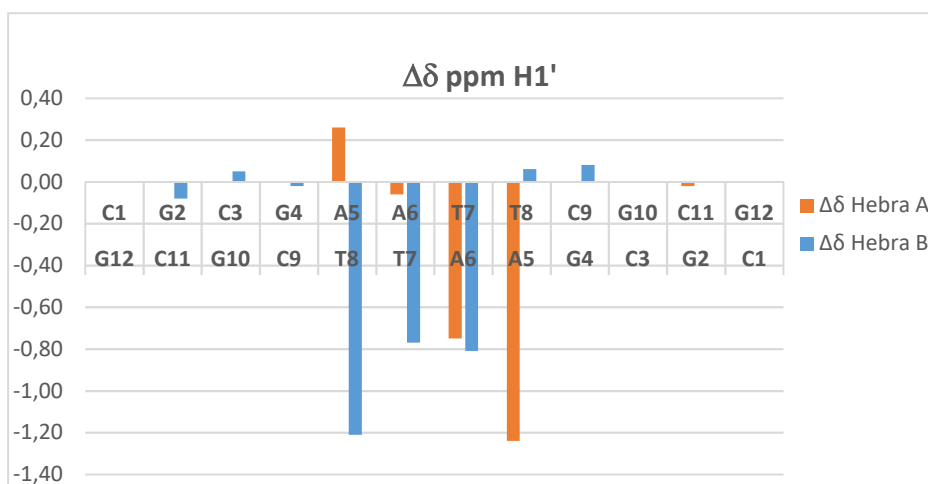


Figure 6 Deoxyriboses H1' proton resonances shift of the A₂T₂ dodecamer complex with bis(benzimidazole)-β-Ala-β-L-Man

In order to solve this problem, we synthesized the bis(benzimidazole)-β-Ala-β-D-Man-¹³C₆ (**10**) uniformly labelled with ¹³C, which is the enantiomer of **9**, and performed the structural elucidation by NMR of a complex formed between this ligand and A₂T₂. Therefore, we performed some two-dimensional (¹H, ¹³C-HSQC-NOESY) and three-dimensional (3D NOESY-HSQC) NMR experiments, being the first time that these experiments are used to study carbohydrate - DNA interaction. In these experiments, we observed some nOes between the carbohydrate and the oligomer A5 deoxyribose H1' proton, confirming its proximity and providing information about its interaction site. With these data, we can confirm that the carbohydrate interaction site occupies about three base pairs of the DNA following the vector binding site (Figure 7).

Both enantiomeric ligands (β-D-Man (**10**) and β-L-Man (**9**)) are placed in the same position in both diastereomeric complexes with A₂T₂. For that reason, we can confirm that the energetic differences in the stability of the diastereomeric complexes measured by CD are exclusively caused by the specific interaction of both carbohydrates β-D-Man and β-L-Man with the oligonucleotide base pairs.

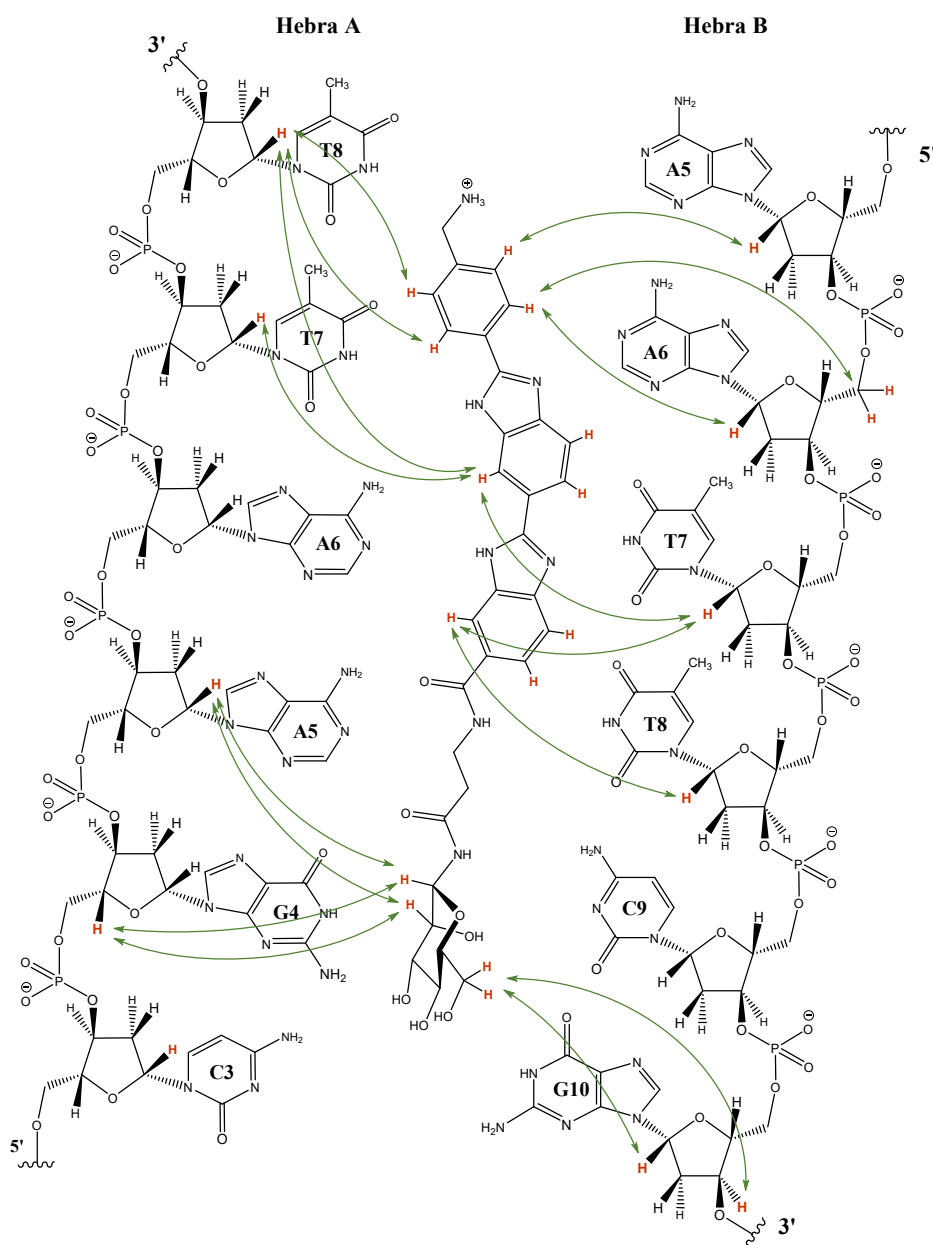


Figure 7 nOes observed between bis(benzimidazole)- β -Ala- β -D-Man and A₂T₂ dodecamer

It is very relevant to remark that NMR experiments with the β -D-Manose derivative (**10**) and A₂T₂ show that positions 1 and 2 of Manose (involved in hydrogen bonding cooperativity) are pointing to the inner region of the minor groove and are close to Adenine 5-A that presents hydrogen bonding acceptors in the groove.

Both, the structural and energetic information obtained by CD for the Glucose (**6**) and Manose (**7**) complexes suggest that the extra contribution of 0.3 kcal/mol to the stability of the manose-A₂T₂ complex is due to the presence of a cooperative hydrogen bonding interaction between OH-2 of Manose and adenine 5 A for this particular DNA sequence.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Esta tesis se enmarca dentro de un proyecto general en el área del reconocimiento molecular entre biomoléculas y sustratos de interés biológico. Esta área ha alcanzado gran interés y desarrollo gracias al avance de las técnicas biofísicas y que permiten caracterizar los complejos formados y su función tanto a nivel estructural como termodinámico.

En concreto, el trabajo que se presenta en esta tesis tiene como objetivo fundamental el estudio a nivel atómico y molecular de la interacción de carbohidratos con el surco menor del ADN.

1.1. Relevancia del papel del carbohidrato en procesos de reconocimiento molecular

Es conocida desde hace tiempo la importancia de los ácidos nucleicos y de las proteínas como biomoléculas capaces de albergar información fundamental para el correcto desarrollo de procesos biológicos en los organismos vivos. Sin embargo, para poder comprender y explicar todos los acontecimientos que tienen lugar a nivel celular, es necesario conocer las bases moleculares de la interacción de otras biomoléculas: los carbohidratos. En los últimos años, se ha ido descubriendo cómo estas moléculas son capaces de superar a los ácidos nucleicos y a los aminoácidos en capacidad de almacenamiento de la información e incluso son capaces de transmitir esta información al actuar como ligandos en gran cantidad de procesos biológicos de reconocimiento molecular.¹

En el denominado dogma central de la biología molecular,² tanto ácidos nucleicos como proteínas tienen un papel decisivo en el flujo de información de los organismos vivos (Figura 1.1). La información codificada en el ADN se transcribe al ARN y se traduce en los ribosomas, dando lugar a la síntesis de proteínas. Sin embargo, este concepto original pasaba por alto las modificaciones post-traduccionales que son alteraciones químicas que sufren las proteínas tras su síntesis.³ Estas modificaciones son de una tremenda importancia pues regulan la actividad, función e interacción de las proteínas con el resto de biomoléculas tales como lípidos, enzimas o ácidos nucleicos.⁴

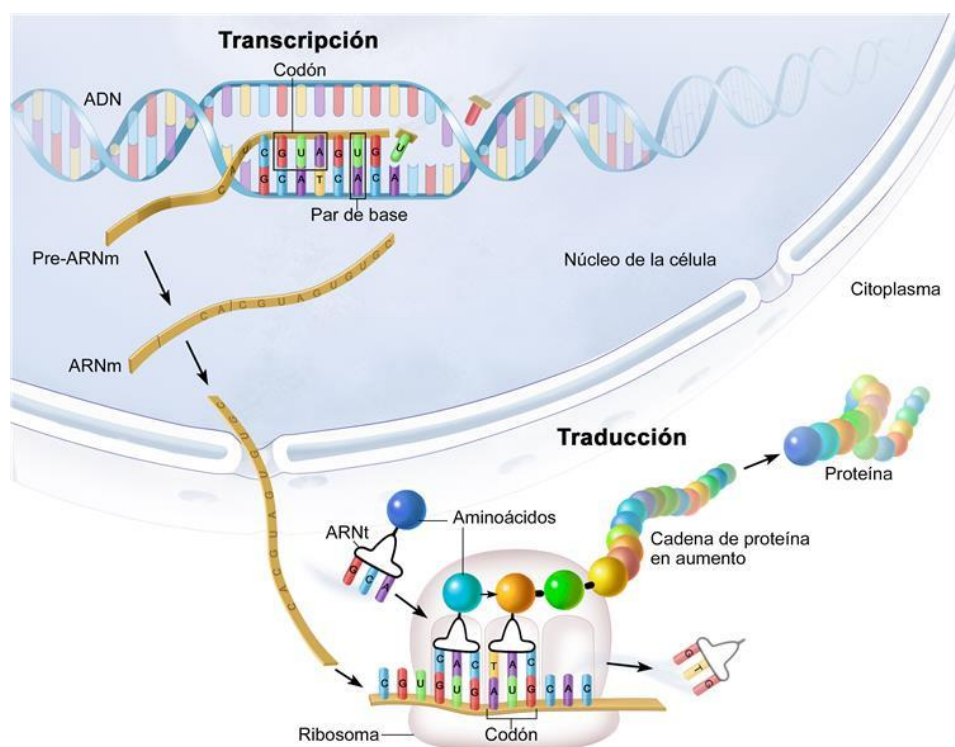


Figura 1.1 Representación esquemática de los procesos de transcripción y traducción (imagen tomada de Terese Winslow LLC)

Gracias al avance de la glicobiología, se ha descubierto una de las modificaciones post-traduccionales más importantes: la glicosilación de residuos de serina y treonina con el carbohidrato *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc). En los últimos años se ha confirmado que esta modificación en proteínas del núcleo celular tiene un papel fundamental en la regulación del proceso de transcripción.⁵ De hecho, en torno a un 25% de las proteínas modificadas por GlcNAc están implicadas en la regulación del proceso de transcripción y se han llegado a describir numerosos ejemplos de factores de transcripción modificados por GlcNAc que regulan la expresión génica, como por ejemplo PDX-1⁶ o CREB.⁷

La presencia del residuo de GlcNAc en estas proteínas nucleares es fundamental en la regulación de la actividad de estos factores de transcripción. Este proceso de transcripción tiene lugar en el núcleo celular e implica una interacción directa con la doble hélice de ADN. Por tanto, es muy necesario comprender en detalle las bases moleculares que rigen el proceso de reconocimiento glicoproteína - ADN y más en concreto, la interacción carbohidrato - ADN. Para poder lograrlo, es necesario desarrollar aproximaciones que permitan simular los complejos procesos de interacción glicoproteína - ADN que ocurren durante la transcripción, es decir, simplificar el sistema

con modelos para analizar las bases de la interacción molecular en detalle. En este marco científico y con este objetivo se plantea el proyecto de investigación en el que se enmarca esta tesis.

1.1.1. Propiedades del ADN: estructura y reconocimiento molecular

Para comprender cómo es el proceso de reconocimiento del ADN, es necesario primero analizar las características principales de esta macromolécula. La conformación mayoritaria de la doble hélice de ADN en el medio fisiológico es su forma B. Está formada por dos cadenas antiparalelas y complementarias de desoxirribonucleótidos que giran una sobre la otra, formando una doble hélice dextrógira. La estructura está estabilizada por enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias (Adenina - Timina y Citosina - Guanina).⁸ Estas bases son aromáticas y planas y se encuentran apiladas una sobre otra de forma paralela, de esta forma sus superficies hidrofóbicas se sitúan en el centro de la estructura, quedando los grupos fosfato hacia el exterior de la doble hélice (Figura 1.2).

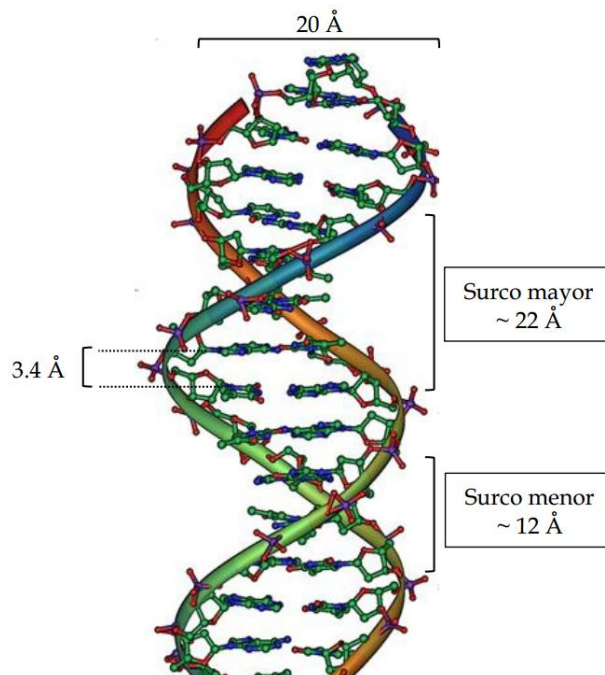


Figura 1.2 Conformación del B-ADN

En la estructura del B-ADN se pueden diferenciar dos surcos con distinta geometría: el surco mayor y el surco menor. El surco mayor es ancho y poco profundo mientras que el surco menor es más estrecho y profundo. A nivel estructural, la conformación del B-

ADN depende de la secuencia de pares bases de la que esté formado, haciendo que la secuencia de bases sea importante no sólo por codificar información genética, sino que también es un código estructural, que tiene influencia sobre la topología del ADN.⁹ Esta variabilidad estructural es debida al distinto número de enlaces de hidrógeno entre pares de bases AT y CG y a las distintas interacciones $\pi - \pi$ entre ellos. Como consecuencia, las secuencias ricas en AT presentan un surco menor más estrecho, mientras en que en secuencias con abundancia de pares de bases CG el surco menor es más amplio.¹⁰ Por otro lado, las bases nitrogenadas cuentan con átomos potencialmente dadores y aceptores de enlace de hidrógeno, generando un patrón característico para cada par de bases (Figura 1.3). Es importante destacar que en el surco menor de secuencias AT únicamente se encuentran aceptores de enlace de hidrógeno. Por otro lado, en secuencias GC se encuentra un grupo amino exocíclico en el surco menor, haciendo que tanto a nivel estérico como electrónico el surco menor sea muy distinto para ambos tipos de secuencias de pares de bases.

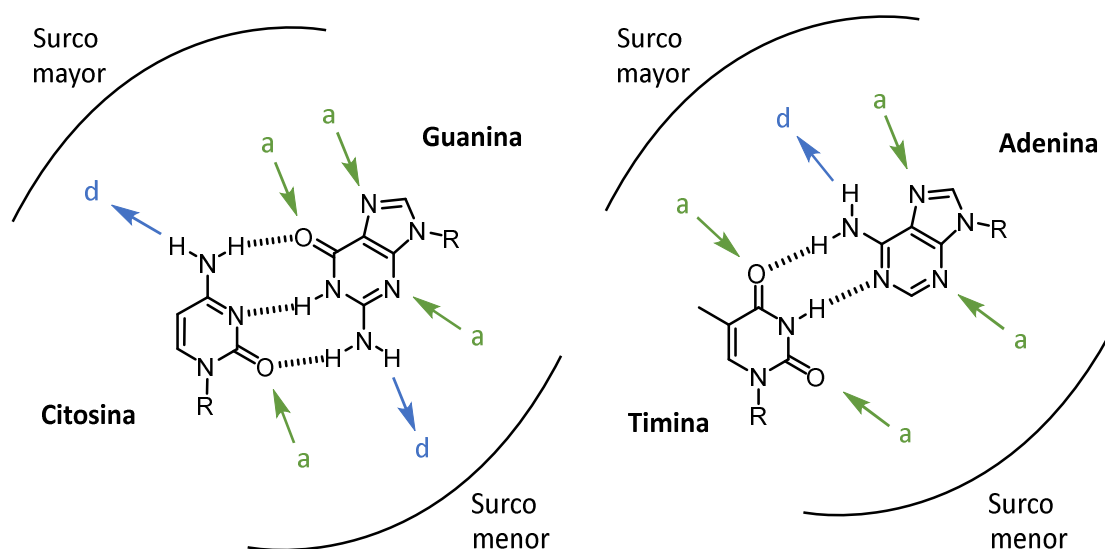


Figura 1.3 Patrón de aceptores (a) y dadores (d) de enlace de hidrógeno en las bases del ADN situadas en cada surco

Los procesos de asociación al B-ADN pueden tener lugar de cuatro maneras muy diferentes: unión externa a los grupos fosfato, intercalación entre los pares de bases y reconocimiento a través del surco mayor y el surco menor (Figura 1.4).

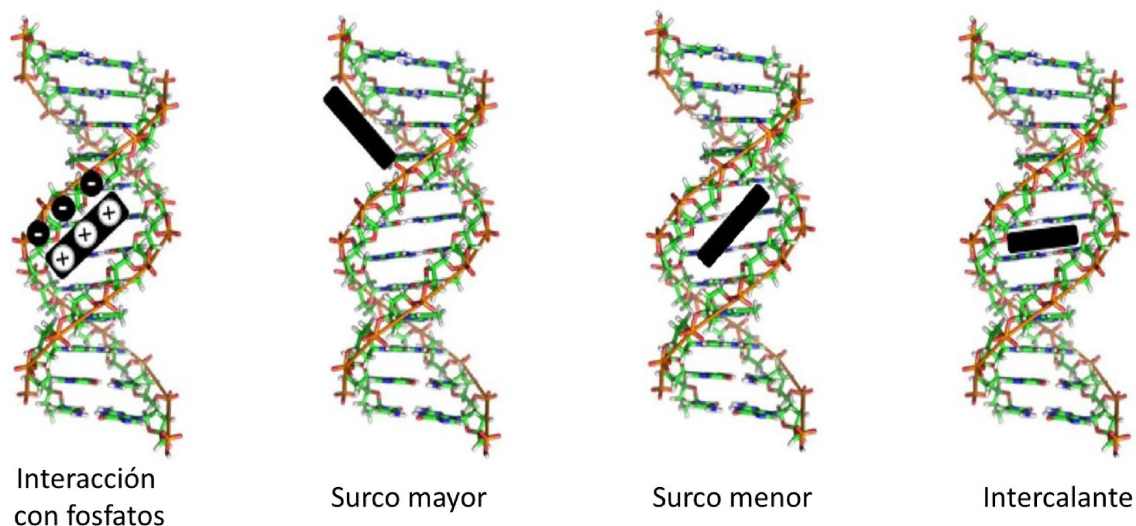


Figura 1.4 Distintos tipos de complejos formados con el ADN

El ADN presenta una elevada carga negativa debido a los grupos fosfato que forman parte de su estructura, que es estabilizada en la naturaleza con cationes Na^+ y Mg^{2+} . Por ello, las moléculas orgánicas cargadas positivamente pueden unirse de forma externa a estos grupos fosfato por interacciones electrostáticas. Este tipo de interacciones dependen de la fuerza iónica del medio y en general, la afinidad de los ligandos que interaccionan de este modo aumenta con concentraciones bajas de sales en disolución.¹¹

Una de las formas de unión al ADN más común es la intercalación. Las moléculas que se unen de este modo suelen ser aromáticas planas, capaces de introducirse en el hueco hidrofóbico que existe entre los pares de bases mediante interacciones $\pi - \pi$. La intercalación suele causar distorsiones en la estructura del ADN.

El reconocimiento molecular del ADN a través de los surcos puede tener lugar tanto con el surco mayor como con el surco menor. En general, la mayor parte de las proteínas que interaccionan con el ADN lo hacen a través del surco mayor.¹² Debido a su tamaño, este surco permite la interacción de una estructura secundaria de proteína que tenga la función de dominio de unión. La variedad de aceptores y dadores existente en este surco, hace de él una diana biológica muy atractiva, existiendo numerosos ejemplos de productos naturales que se unen a este surco con especificidad de secuencia.¹³ Sin embargo, las moléculas orgánicas pequeñas que no actúan como intercalantes, suelen interaccionar con el ADN a través del surco menor. Estos ligandos suelen tener unas características similares, tales como una curvatura adaptada al giro del surco menor, y

alguna región hidrofóbica. Además, La mayoría de estos ligandos establecen enlaces de hidrógeno con las bases nitrogenadas y pueden tener cargas positivas, por lo que las interacciones electrostáticas también son importantes para esta unión. La cooperatividad entre todas estas interacciones hace que estos ligandos formen complejos muy estables con el ADN.

1.1.2. El carbohidrato en procesos de reconocimiento molecular

Los carbohidratos forman uno de los tipos más abundantes y complejos de biomoléculas de la naturaleza. No sólo son capaces de formar polisacáridos y oligosacáridos, sino que en muchas ocasiones también forman parte de otros tipos de biomoléculas (como las glicoproteínas) y forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos transmitiéndoles su quiralidad. Entre sus funciones están el almacenamiento de energía, servir de soporte estructural en plantas e insectos e incluso desempeñan un papel crucial en el reconocimiento celular y respuesta inmune.¹⁴

A nivel molecular, cada monosacárido de seis carbonos puede presentar hasta 16 isómeros diferentes, en los que sus hidroxilos adoptan diferentes posiciones espaciales, dando a los monosacáridos un carácter tridimensional. De esta forma, se pueden definir seis caras en un carbohidrato, donde las más importantes son las denominadas cara α y cara β , definidas por el plano que contiene a los átomos de carbono del anillo de piranosa (Figura 1.5).

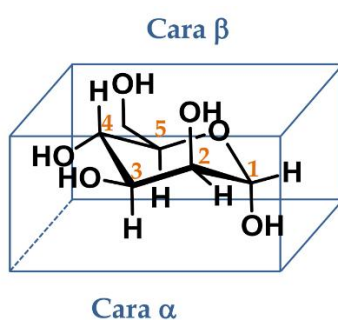


Figura 1.5 Representación de las caras de un monosacárido (α -D-Manosa)

Un solo carbohidrato puede incorporarse de múltiples maneras a una estructura más compleja, pudiendo dar lugar a una enorme variedad estructural como polisacáridos ramificados. Por ello, estas moléculas poseen un elevado potencial a la hora de codificar información.

En los últimos años, el avance en técnicas como Rayos-X y RMN ha permitido obtener información a nivel atómico del proceso de reconocimiento molecular de carbohidratos, especialmente con proteínas. Dada la presencia de numerosos grupos hidroxilo en los carbohidratos, es de esperar que los enlaces de hidrógeno sean una de las principales interacciones implicadas en estos procesos de reconocimiento.¹⁵ Además, multitud de estudios de RMN y Rayos-X han mostrado como los anillos aromáticos suelen estar presentes en centros de reconocimiento de proteínas y son cruciales en el proceso de interacción.¹⁶ Esto se debe a que la cara más hidrofóbica del carbohidrato interactúa con ese residuo aromático a través de interacciones CH - π . La coexistencia de ambos tipos de interacción (enlaces de hidrógeno y CH - π) fue propuesta inicialmente por Quioco y Lemieux gracias a numerosos estudios llevados a cabo entre carbohidratos y lectinas.¹⁷ Por ello, es necesario conocer bien la contribución de estos dos tipos de interacciones: las CH - π y los enlaces de hidrógeno.

1.1.2.1. Interacciones CH - π

Las interacciones CH - π son un tipo de fuerzas atractivas entre residuos CH polarizados y la nube π de un anillo aromático. Un requisito para que se produzca este tipo de fuerzas es la direccionalidad, cuanto más lineal sea la interacción, más fuerte será (Figura 1.6).¹⁸ Este tipo de fuerzas es débil, sin embargo, es una interacción cooperativa, de forma que la interacción simultánea de varios grupos CH con un mismo sistema aromático, aumenta la fuerza de la interacción.¹⁹ De esta forma, un carbohidrato que posea tres grupos CH axiales en una misma cara puede interactuar de manera muy efectiva con una superficie aromática.

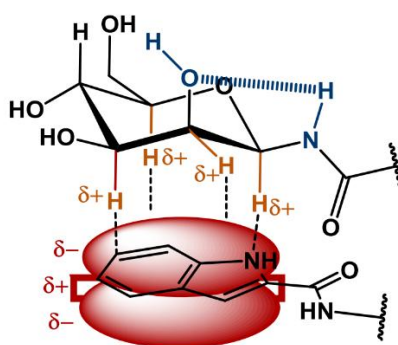


Figura 1.6 Representación esquemática de las interacciones CH - π en la β -D-Manosamida

En los últimos años se ha estudiado en profundidad acerca de la naturaleza de este tipo de interacción,²⁰ aunque de momento no se tiene una descripción detallada y cuantificada de su mecanismo de acción.

1.1.2.2. Enlace de hidrógeno y cooperatividad

El enlace de hidrógeno es una fuerza atractiva entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo (denominado dador) y otro átomo electronegativo con un par de electrones no compartido (denominado aceptor). De esta forma se genera un dipolo en el que el átomo de hidrógeno tiene una carga parcial positiva y el aceptor una carga parcial negativa (Figura 1.7 a). La fuerza del enlace de hidrógeno aumenta al incrementarse el momento dipolar entre el hidrógeno y el aceptor. Es conocido que la formación del enlace de hidrógeno implica varias contribuciones energéticas de magnitud similar: energía electrostática, repulsión de intercambio, energía de transferencia de carga, energía de polarización y fuerzas de dispersión.²¹

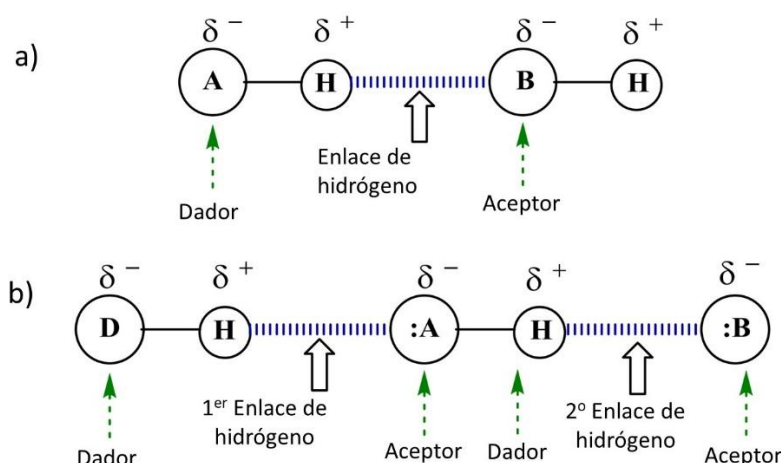


Figura 1.7 Representación esquemática de a) un enlace de hidrógeno sencillo y b) una red cooperativa de enlace de hidrógeno

Los carbohidratos presentan un elevado número de hidroxilos muy próximos, haciendo posible la presencia de enlaces de hidrógeno tanto intramoleculares como intermoleculares. Estos enlaces estabilizan conformaciones específicas en oligosacáridos y, por supuesto, son fundamentales en los procesos de reconocimiento molecular. Los hidroxilos tienen la particularidad de poder ejercer al mismo tiempo tanto de dadores como de aceptores de enlace de hidrógeno, haciendo posible que tenga lugar el fenómeno conocido como cooperatividad de enlace de hidrógeno.

Este fenómeno fue definido por Frank y Wen como el fortalecimiento de un primer enlace de hidrógeno entre dador y aceptor cuando se forma un segundo enlace de hidrógeno entre estas dos especies y un tercer centro (Figura 1.7 b).²² En este sistema, aumenta de manera considerable el momento dipolar de los enlaces de hidrógeno implicados, haciéndolos más fuertes que un enlace de hidrógeno sencillo.

Lamentablemente, es muy difícil estudiar este tipo de sistemas en medio fisiológico, dada la complejidad estructural de los carbohidratos y la dificultad de detección de los grupos hidroxilo en agua por RMN. La mayoría de los estudios experimentales que han encontrado evidencias de esta cooperatividad se han realizado en estado sólido,²³ mientras que los estudios en disolución acuosa son más escasos.²⁴

1.1.3. Papel del carbohidrato en ligandos del ADN

Desde hace varias décadas, se conocen fármacos que se unen al ADN y que contienen carbohidratos en su estructura, sin embargo, la función del azúcar en estas moléculas era desconocido. Los primeros estudios que pusieron de manifiesto la importancia del carbohidrato se llevaron a cabo con la familia de antibióticos de las antraciclinas, que además cuentan con capacidad antitumoral (Figura 1.8, doxorubicina). En estos compuestos se vio que el número de carbohidratos y su patrón de sustitución tiene un gran impacto en la actividad biológica de estas moléculas. De hecho, la ausencia de este azúcar conducía a la pérdida de actividad de los mismos.²⁵ Gracias a las técnicas de Rayos-X y RMN se pudieron obtener pruebas estructurales con estos derivados al formar complejos con el ADN que sugerían una posible interacción entre el carbohidrato y el surco menor.²⁶

Otra familia de derivados antitumorales que cuentan con carbohidratos en su estructura son las bleomicinas (Figura 1.8), unos glicopéptidos capaces de fragmentar la cadena de ADN. En este caso, la ausencia del carbohidrato no afecta a la función del compuesto, sin embargo, su afinidad por el ADN puede caer hasta 35 veces.²⁷ Otro ejemplo donde el carbohidrato es esencial para la interacción con el ADN es la rebecamicina (Figura 1.8). Esta familia de glico-indolocarbazoles presenta una actividad mucho mayor que los correspondientes derivados sin glicosilar, demostrando que el azúcar es un elemento clave en el proceso de interacción.²⁸

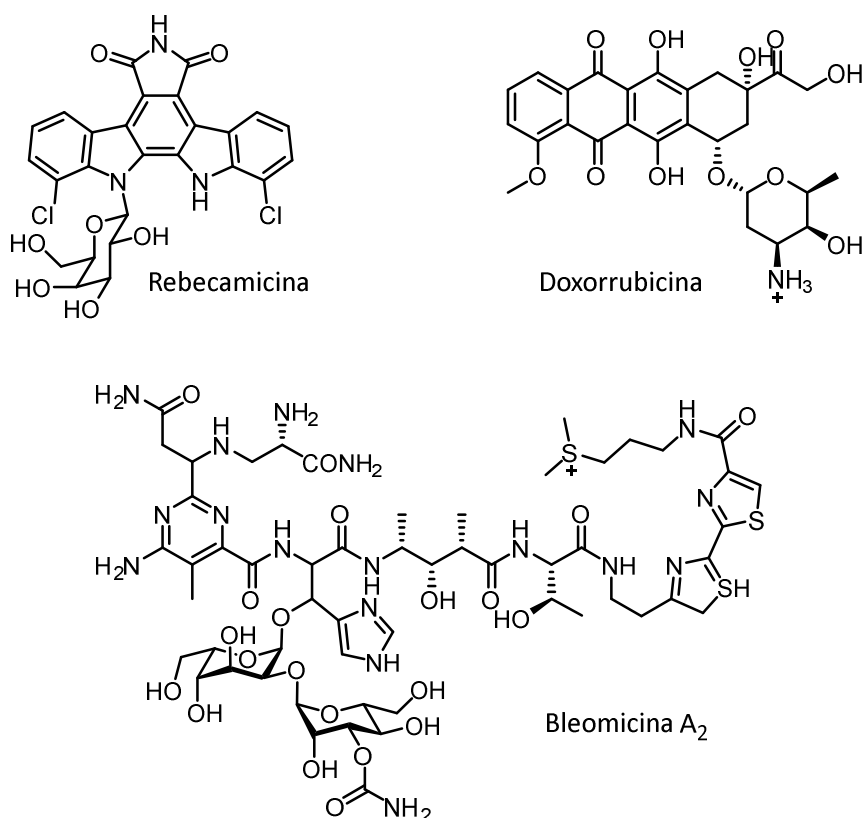


Figura 1.8 Glico-derivados con actividad antitumoral

El ejemplo que mejor representa esta importancia del carbohidrato en el proceso de reconocimiento del ADN y su papel en la selectividad de secuencia es la calicheamicina γ_1^I (Figura 1.9). Este antitumoral interacciona con el surco menor del ADN, provocando la ruptura de la doble hélice en determinadas secuencias. Los estudios acerca de su selectividad de secuencia mostraron un nuevo tipo de selectividad, diferente a la típica hacia pares de bases AT o GC. En este caso, el ligando mostró preferencia hacia secuencias que tuviesen tres o más pirimidinas seguidas.²⁹

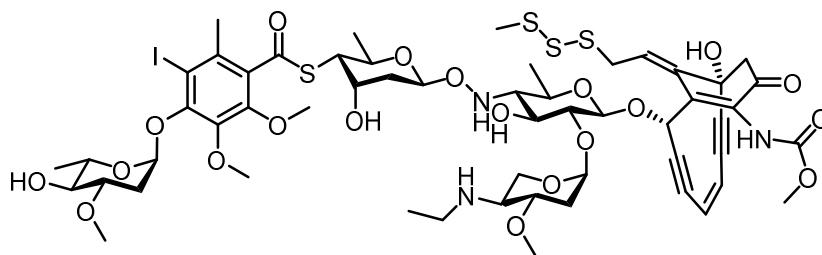


Figura 1.9 Estructura de la calicheamicina γ_1^I

Los estudios llevados a cabo con derivados de calicheamicina en cuya estructura faltaban uno o dos carbohidratos, demostraron que el azúcar era el responsable de la

selectividad de secuencia hacia las pirimidinas.³⁰ Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios por dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés, *Circular Dichroism*) y RMN en los que se demostró cómo los carbohidratos de la calichamicina se situaban en el surco menor del ADN, entrando en contacto con las bases pirimidínicas.³¹ En concreto, es capaz de interaccionar con secuencias tipo ACCT, TTTT, TCCT y en todas ellas el oligosacárido se une en una posición idéntica.³² Los carbohidratos que constituyen este compuesto son inusualmente hidrofóbicos, por lo que las interacciones hidrofóbicas también juegan un papel importante en su interacción con el ADN.³³

Por último, otro ejemplo de ligando del ADN con carbohidratos con carácter hidrofóbico es la cromomicina A₃, un derivado del ácido aureólico (Figura 1.10). De nuevo, en este caso el fragmento sacarídico es fundamental para la unión al ADN.³⁴

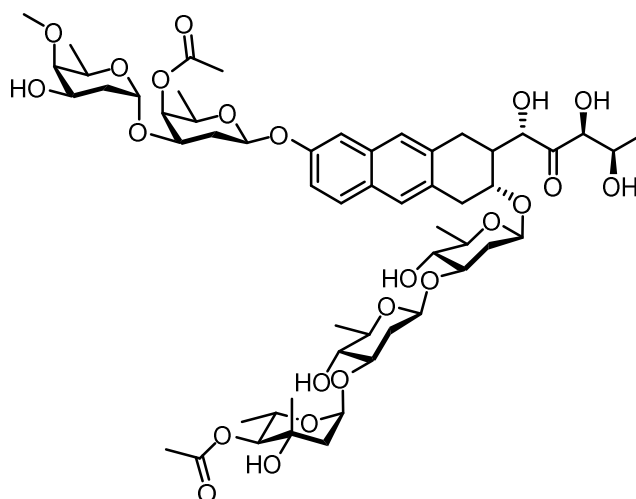


Figura 1.10 Estructura de la cromomicina A₃

En general, se han descrito numerosos ejemplos de ligandos del ADN que contienen carbohidratos en su estructura, sin embargo, pocos de ellos están compuestos exclusivamente de azúcares, como algunos antibióticos derivados de aminoglicósidos (neomicina) y siempre se trata de azúcares catiónicos. Se ha demostrado que estos derivados son capaces de unirse tanto al ARN como al ADN en distintas formas: surco mayor,³⁵ triples hélices³⁶ e incluso cuádruples³⁷ mediante interacciones electrostáticas. Estos estudios están limitados a polisacáridos formados al menos por cuatro unidades de monosacárido y con grupos cargados positivamente, puesto que un monosacárido aislado no presenta afinidad por el ADN.

Por tanto, el estudio de la interacción entre carbohidratos y ADN presenta, por un lado, la dificultad del diseño de una estrategia eficaz para poder acercar azúcares sencillos y neutros hasta el ADN. Por otro lado, el B-ADN es un continuo de pares de bases y, a diferencia de otras biomoléculas como las proteínas, no tiene un centro de interacción definido. Esto hace que sea difícil la selectividad de secuencia y se pueda generar una gran variedad complejos. Así, para evitar estos inconvenientes es necesario diseñar una estrategia que permita el estudio de la interacción de distintos carbohidratos con distintos tipos de secuencias de ADN. De esta forma, podrían establecerse unas pautas estructurales para el reconocimiento carbohidrato - ADN. Así, se facilitaría la comprensión de dichas interacciones y ayudaría al desarrollo de moléculas glicosiladas capaces de unirse específicamente a ciertas secuencias de ADN. En nuestro caso, hemos escogido como diana el surco menor del ADN.

1.2. Antecedentes

El proyecto de investigación en el que se enmarca esta tesis tiene como objetivo comprender y establecer las bases moleculares del reconocimiento molecular entre carbohidratos y el surco menor del ADN.

En el grupo de investigación, se ha aplicado el concepto de la cooperatividad de enlace de hidrógeno para favorecer la formación de complejos estables entre carbohidrato y piridina en disolventes orgánicos.³⁸ En base a estos estudios, la primera aproximación planteada para el diseño de carbohidratos y posterior estudio de la interacción carbohidrato - ADN consistió en emplear esta cooperatividad de enlace de hidrógeno como herramienta para favorecer la interacción del azúcar con los pares de bases del ADN. Los estudios llevados cabo pusieron de manifiesto cómo una adecuada disposición relativa de los centros dadores y aceptores de enlace de hidrógeno en el carbohidrato permitía la formación de redes cooperativas de enlace de hidrógeno intermoleculares eficaces con el par de bases GC,³⁹ así como con los grupos fosfato en medio apolar.⁴⁰

En base a estos estudios, se pudieron diseñar carbohidratos que permitían establecer redes de enlace de hidrógeno intramoleculares controlando además la direccionalidad de esa red en disolventes apolares.⁴¹ Para ello, se introdujo un grupo funcional determinado, cercano a los hidroxilos del carbohidrato que pudiera polarizar los enlaces de hidrógeno en una dirección determinada. De esta manera, se potenciaba el carácter dador o aceptor de un hidroxilo en concreto, convirtiéndolo de esta manera en un dador

o aceptor cooperativo de enlace de hidrógeno. El grupo funcional elegido fue el grupo amida, cuyo NH es capaz de iniciar la red cooperativa como dador, formando un anillo de cinco miembros con el hidroxilo más próximo, convirtiéndolo en un dador cooperativo de enlace de hidrógeno o permitiéndole extender más aun la red cooperativa de forma intramolecular con otro hidroxilo cercano del carbohidrato. Este diseño pudo ponerse en práctica empleando glicosilamidas derivadas de β -D-Manosa y β -D-Talosa (Figura 1.11). En el caso de β -D-Manosa se genera un anillo de cinco miembros, mientras que en β -D-Talosa la red queda extendida generándose además un anillo de seis miembros fusionado con el de cinco.

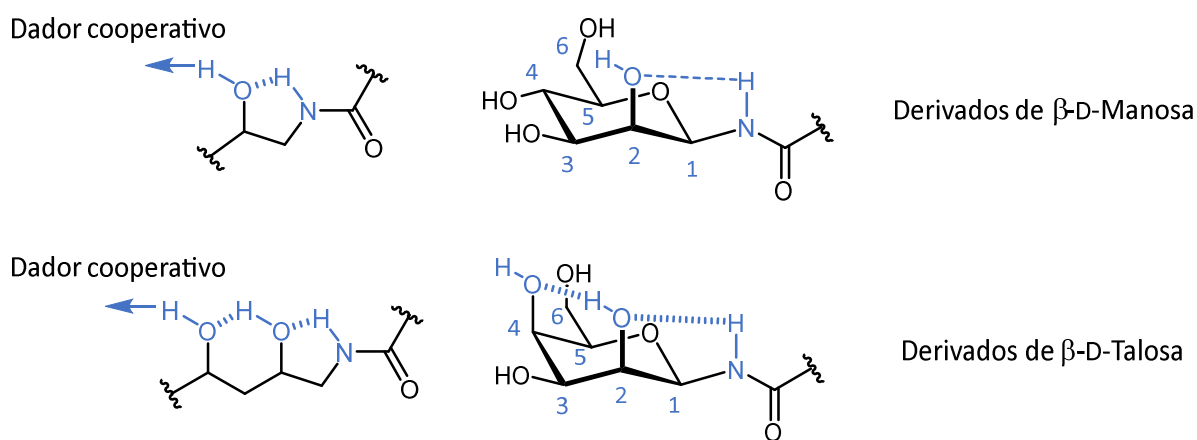


Figura 1.11 Representación de las redes cooperativas de enlace de hidrógeno en β -D-Manosa y β -D-Talosa y la numeración de estos carbohidratos

El siguiente paso en el estudio del reconocimiento del ADN por carbohidratos consistió en llevar estos conocimientos al medio fisiológico, con el objetivo de conseguir una interacción directa de los azúcares con el ADN. De esta forma, se pretendía obtener datos estructurales y termodinámicos sobre la influencia del carbohidrato en el proceso de reconocimiento del ADN. Para lograr acercar los azúcares a la doble hélice de ADN, la estrategia seguida ha sido preparar glicoderivados formados por un carbohidrato sencillo unido covalentemente a un residuo que sea capaz de unirse específicamente al surco menor del ADN. El empleo de un ligando conocido del ADN como vehículo portador del carbohidrato (al que llamamos vector), resultó ser una metodología eficaz para obtener información estructural sobre la función del azúcar en su interacción con el ADN.

El diseño del vector que actúa como ligando del surco menor empleado hasta ahora en el grupo de investigación, está basado en las oligoamidas heteroaromáticas del

código de reconocimiento del ADN desarrollado por el Prof. Dervan⁴² que a su vez está basado en la estructura de los antibióticos naturales distamicina y netropsina (Figura 1.12).

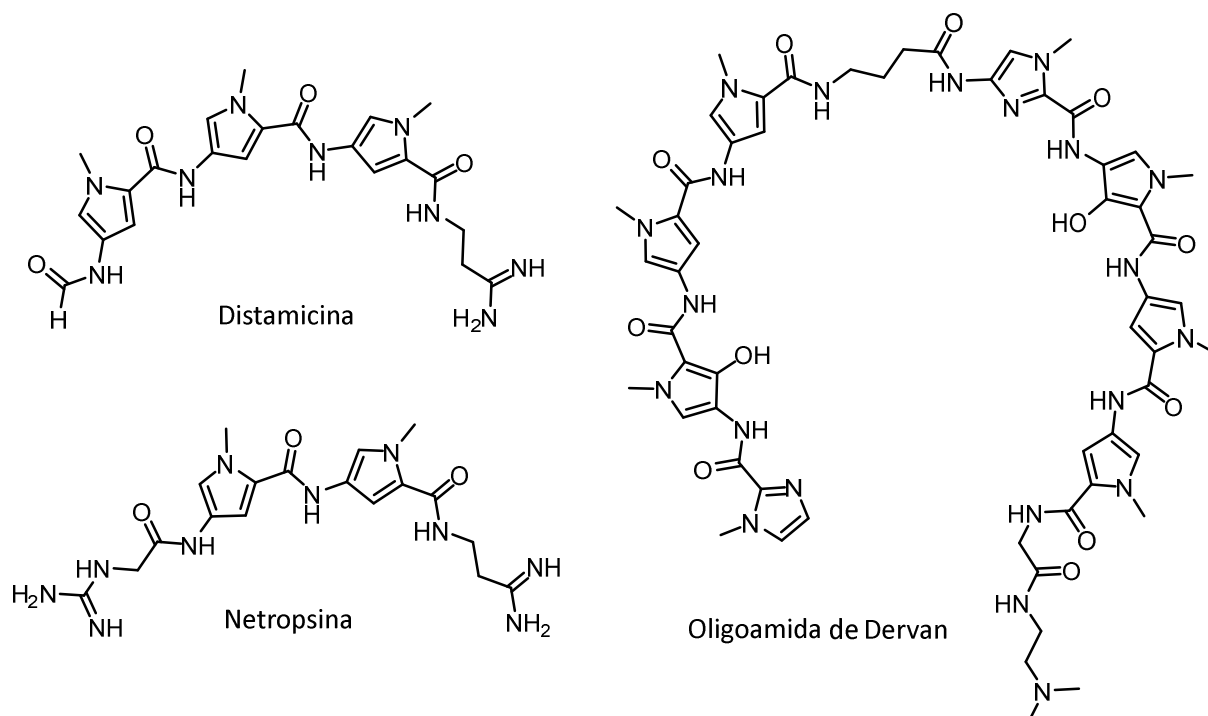


Figura 1.12 Estructura de los antibióticos distamicina y netropsina y una de las oligoamidas del Prof. Dervan

En el grupo de investigación del Prof. Dervan se desarrollaron unos ligandos del ADN en los que dos fragmentos de oligoamida se unen covalentemente mediante un espaciador alquílico formando dímeros.⁴³ En estas estructuras, el fragmento espaciador que resultó ser más eficiente en cuanto a afinidad era el ácido γ -aminobutírico.⁴⁴ Estos ligandos se pliegan en forma de horquilla al unirse al ADN, según se ha demostrado mediante estudios de RMN gracias a la detección de nOes inter-hebra entre residuos aromáticos enfrentados.⁴⁵ Esta horquilla además se dispone de manera arqueada en el proceso de interacción, de forma que los grupos NH quedan orientados hacia el interior del surco menor y los metilos de los anillos aromáticos se sitúan hacia el exterior. Con este tipo de dímeros covalentes se han logrado afinidades en el rango nanomolar⁴⁶ y selectividad de secuencia elevada.

1.2.1. Vector derivado de oligoamida heteroaromática neutra

La eficacia de estas oligoamidas heteroaromáticas a la hora de reconocer una determinada secuencia de ADN y el conocimiento de las bases de su interacción, hace de ellas unos muy buenos candidatos para emplearlas como vectores y que logren acercar carbohidratos hasta el surco menor del ADN. Por ello, se decidió emplear este tipo de derivados como vector para unirles covalentemente los carbohidratos, dando lugar a una primera generación de glico-oligoamidas neutras (Figura 1.13).

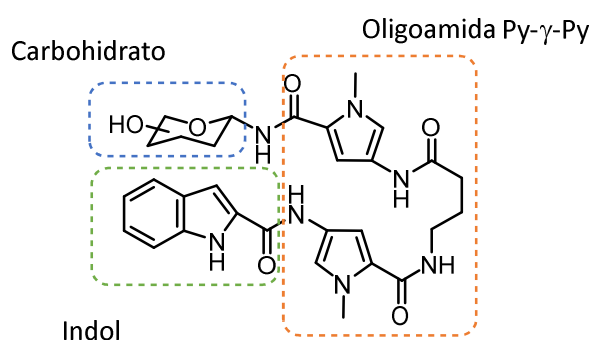


Figura 1.13 Estructura general de las glico-oligoamidas neutras

Con este diseño se pretendía mantener la conformación plegada en forma de horquilla de las oligoamidas del Prof. Dervan. Por ello, la estructura contiene dos pirroles enfrentados unidos mediante un espaciador de ácido γ -aminobutírico que favorece las interacciones $\pi - \pi$. Además, este diseño tendría especificidad hacia secuencias de pares de bases AT, según el código de reconocimiento del Prof. Dervan.⁴⁷ En un extremo del fragmento oligoamida se introdujo el carbohidrato unido por su posición anomérica mediante un enlace amida. En el otro extremo de la oligoamida se introdujo un anillo de indol que establecería interacciones CH - π con el carbohidrato. Se escogió un indol como mimético del pirrol en las oligoamidas del Prof. Dervan para mantener la estructura plegada de las oligoamidas y al mismo tiempo obtener una mayor superficie aromática que favorezca las interacciones CH - π con el carbohidrato.

Mediante esta estrategia, el grupo de investigación ha logrado acercar con éxito diversos carbohidratos hasta el surco menor de diversos polímeros de ADN y obtener información estructural sobre el papel del carbohidrato en la interacción por RMN.⁴⁸ Estos ligandos mostraron preferencia por secuencias ricas en pares de bases AT en estudios con polímeros de ADN, con afinidades variables en función del anómero y el carbohidrato introducido.⁴⁹ Además, se consiguió realizar un análisis estructural de

cómo se disponen estos derivados en el interior del surco menor, demostrándose que el carbohidrato se encontraba cercano a la región interna del surco menor (Figura 1.14).⁵⁰

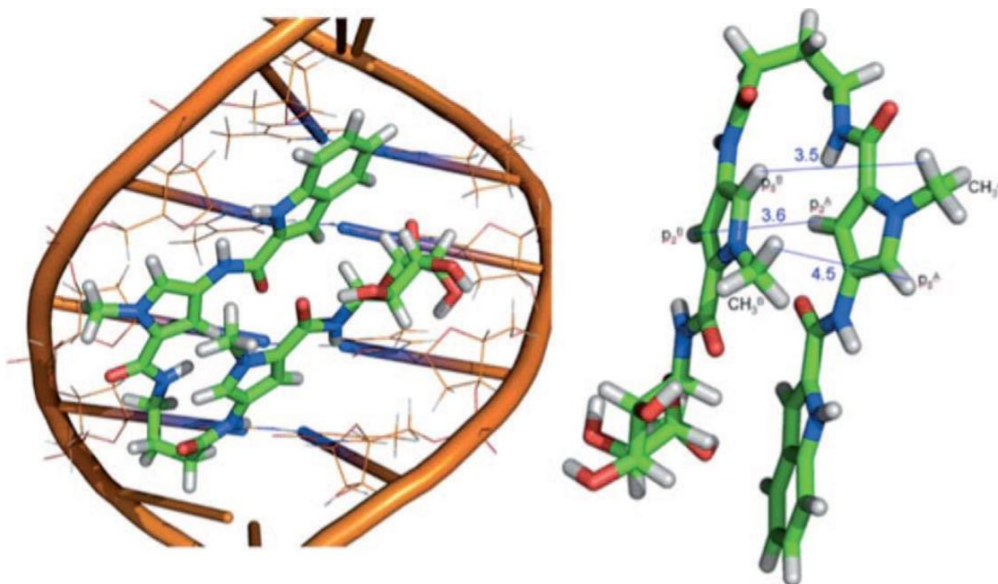


Figura 1.14 Izquierda: Complejo formado por una glico-oligoamida derivada de β -D-Galactosa con el dodecámero de Dickerson (5'-CGCGAATTCGCG-3'). Derecha: estructura de la oligoamida en disolución acuosa

Una vez se logró el acercamiento de carbohidratos hasta el surco menor del ADN en medio acuoso, el siguiente paso en la investigación fue la introducción de azúcares con centros cooperativos de enlace de hidrógeno. De esta forma, se podrían establecer redes cooperativas de enlace de hidrógeno tanto intramoleculares (dentro del carbohidrato) como intermoleculares, participando en un proceso de interacción con el ADN. Por tanto, podrían trasladarse los estudios previos del grupo sobre cooperatividad en sistemas sencillos a sistemas más complejos, similares a los que suceden en la naturaleza. De esta forma, se sintetizaron y estudiaron las glico-oligoamidas derivadas de β -D-Manosa y β -D-Talosa, ambas con el hidroxilo 2 del carbohidrato en posición axial, de forma que se estableciese la red cooperativa de enlace de hidrógeno iniciada con el grupo NH de la amida anomérica (Figura 1.15).

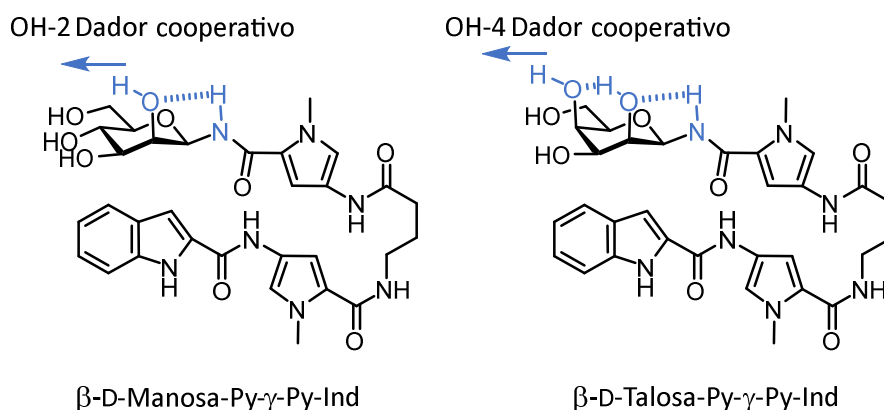


Figura 1.15 Glico-oligoamidas derivadas de β -D-Manosa y β -D-Talosa, con los patrones de enlace de hidrógeno intramoleculares que forman

Es muy importante destacar que en estos derivados se confirmó la existencia de los enlaces de hidrógeno intramoleculares en agua mediante experimentos de RMN.⁵¹

Adicionalmente, con la intención de estudiar la influencia de la quiralidad del carbohidrato en su interacción con el ADN, también se sintetizaron oligoamidas con carbohidratos de la serie L, encontrándose diferencias interesantes de forma cualitativa en el estado asociado entre ambas series de azúcares, D y L por RMN empleando polímeros de ADN.⁵²

Una vez alcanzado este punto de la investigación, fue necesario poder cuantificar la interacción de estos derivados para así poder conocer la contribución extra del carbohidrato a la interacción con el surco menor del ADN. Sin embargo, estas oligoamidas neutras presentan algunas restricciones que limitan este estudio, como falta de solubilidad en agua o una baja constante de afinidad por el ADN que impide el empleo de la microcalorimetría para caracterizar termodinámicamente el proceso de interacción.

1.2.2. Vector derivado de oligoamida heteroaromática catiónica

Para solucionar estos inconvenientes, se decidió realizar alguna modificación sobre el vector de oligoamida que permitiese aumentar la solubilidad de los derivados e incrementar su afinidad por el ADN sin modificar demasiado la estructura original del vector. Para ello, se introdujo un grupo amino que, a pH fisiológico, se encuentra protonado en la posición β del fragmento γ -aminobutírico, dando lugar a una segunda generación de glico-oligoamidas como ligandos del ADN (Figura 1.16).⁵³

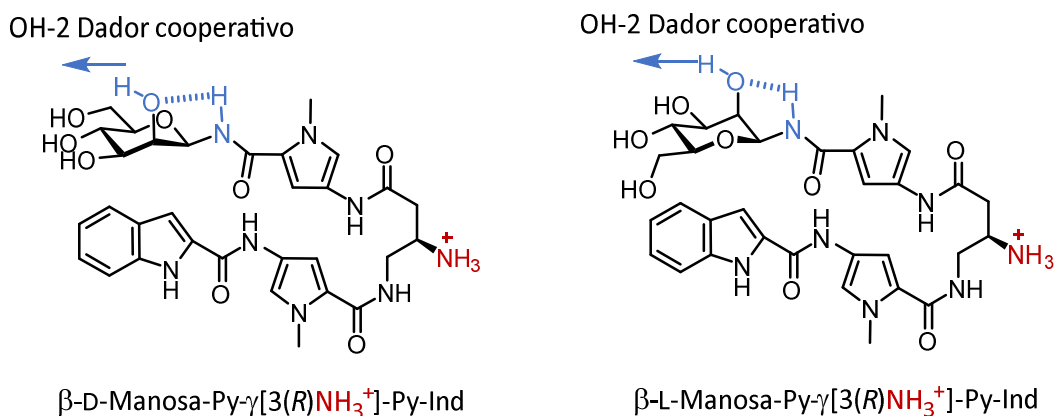


Figura 1.16 Glico-oligoamidas catiónicas derivadas de β -D-Manosa y β -L-Manosa.

Gracias a esta modificación, se pudo mejorar notablemente tanto la solubilidad en agua de los derivados como su afinidad por el ADN, pero manteniendo las propiedades que ya se conocían de las glico-oligoamidas neutras: afinidad por secuencias que contienen AT y una conformación plegada en el interior del surco menor del ADN al formar los complejos. Cabe destacar, además, que en estos derivados catiónicos también pudo detectarse y caracterizarse en disolución acuosa la presencia del enlace de hidrógeno intramolecular en derivados de β -Manosa (D y L) entre el NH en posición anomérica y el hidroxilo 2 de la Manosa.

Sin embargo, aunque la interacción con polímeros de ADN pudo determinarse cualitativamente, cuando se intentó estudiar la interacción por microcalorimetría para cuantificarla, se detectó un proceso exotérmico muy lento al realizar experimentos de dilución con estas glico-oligoamidas catiónicas, que pudo ser asociado a un proceso de agregación en agua. Este comportamiento era difícil de prever con antelación y, aunque no debería ser un problema en un principio, en este caso particular el equilibrio de formación y ruptura del agregado resultó ser demasiado lento, lo que dificulta en gran medida el análisis de los termogramas obtenidos y, desafortunadamente, impidió la cuantificación del proceso de interacción. En la Figura 1.17 se muestra el termograma obtenido para la dilución de la oligoamida catiónica β -D-Xilosa en agua y se puede observar la presencia de un calor residual tras cada inyección que impide la recuperación de la línea base.

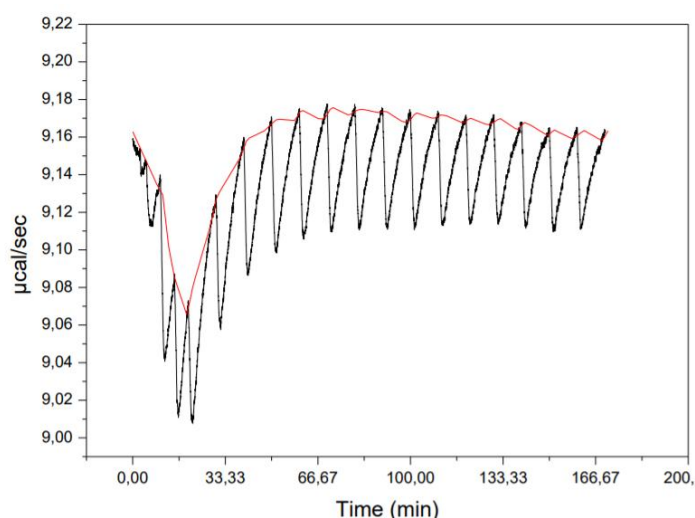


Figura 1.17 Termograma obtenido durante la dilución de la oligoamida catiónica derivada de β -D-Xilosa en agua

Este lento proceso de autoasociación impidió la cuantificación termodinámica del proceso de interacción de los ligandos con el ADN y, dado que este problema es intrínseco al propio vector de oligoamida, no pudo ser solucionado. Por todo ello, en este punto de la investigación es necesario proponer un nuevo diseño de vector que sea un buen vehículo para acercar carbohidratos al surco menor del ADN y permita extraer información termodinámica y estructural acerca del proceso de reconocimiento de carbohidratos por el ADN.

1.3. Diseño de un nuevo vector derivado de bis(benzimidazol)

Teniendo en cuenta que la agregación en agua ha sido un problema para los vectores tipo oligoamida y que, por su estructura, la mayoría de ligandos del surco menor van a presentar procesos de autoasociación en agua, lo ideal es que el vector nuevo esté basado en un ligando del ADN cuya autoasociación haya sido caracterizada y su cinética sea adecuada para el estudio termodinámico por microcalorimetría. Además, el nuevo vector debe tener características similares a las del vector de tipo oligoamida en cuanto a su interacción con el ADN, como por ejemplo la selectividad hacia secuencias AT.

Teniendo estos factores en cuenta, la familia de derivados de Hoechst puede ser una buena candidata para nuestro propósito (Figura 1.18). Son unos compuestos fluorescentes ampliamente utilizados para el marcaje de núcleos celulares y cromosomas. Estos compuestos son ligandos del surco menor, selectivos de secuencias

AT⁵⁴ y su proceso de unión al ADN ha sido estudiado en profundidad, por técnicas muy diversas tales como RMN⁵⁵, Rayos-X⁵⁶ o dicroísmo circular⁵⁷, especialmente el derivado de Hoechst 33258.

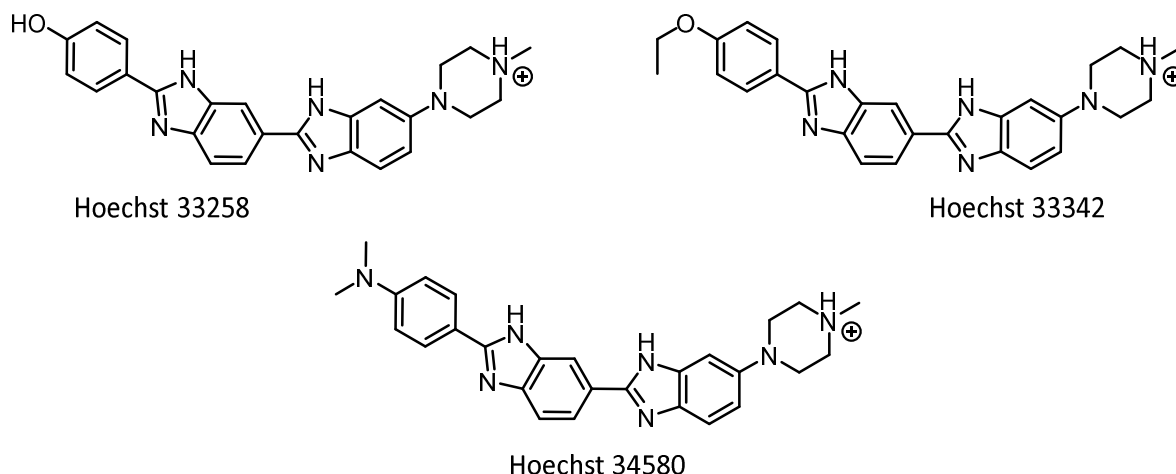


Figura 1.18 Estructura de derivados de la familia de Hoechst

Además, el proceso de autoasociación en agua del Hoechst 33258 ha sido estudiado y descrito termodinámicamente en detalle por el Prof. Buurma y el Prof. Haq por microcalorimetría,⁵⁸ con constantes de autoasociación en torno a $6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, por lo que este tipo de estructura es una muy buena candidata para utilizarla como vector en nuestros estudios.

Adicionalmente, un requisito necesario para la unión de nuestros carbohidratos, es que el vector seleccionado cuente en su estructura con un grupo ácido para poder generar las glico-amidas de nuestro interés. En los trabajos del Prof. Nielsen⁵⁹ y el Prof. Jacobsen⁶⁰ se emplea un análogo del Hoechst para realizar estudios de interacción entre péptidos y ADN. Estos péptidos se unen a un análogo de Hoechst con dos núcleos de benzimidazol mediante un enlace amida (Figura 1.19).

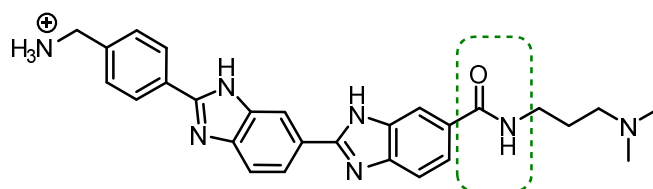


Figura 1.19 Estructura del análogo de Hoechst empleado por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen

En estos trabajos, el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen han estudiado las propiedades de UV y fluorescencia de este derivado (Figura 1.19), en los que se mostró cómo la emisión de fluorescencia varía muy poco al pasar del estado libre al estado asociado al ADN, en contra de lo que sucede con el Hoechst.⁶¹ Además, se ha estudiado la interacción de este derivado con oligonucleótidos de ADN por RMN concluyendo que conserva las mismas propiedades de interacción que los derivados de Hoechst, es decir, son ligandos del surco menor y selectivos de secuencias AT. Sin embargo, la interacción de este derivado no ha sido estudiada por dicroísmo circular ni se ha cuantificado la afinidad del ligando mediante ninguna técnica, por lo que estos aspectos son desconocidos.

Por tanto, en base a estos estudios y dada la similitud estructural con el Hoechst 33258 cuya agregación ha sido caracterizada, se ha seleccionado la estructura de bis(benzimidazol) empleada por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen en sus estudios como base del nuevo diseño para nuestro vector. A este núcleo de bis(benzimidazol) es posible unirle a través del enlace amida los distintos carbohidratos de interés, que serán transportados hasta el interior del surco menor del ADN. De esta forma, la estructura general propuesta para generar los nuevos ligandos y realizar el estudio de la interacción carbohidrato - ADN es la mostrada en la Figura 1.20.

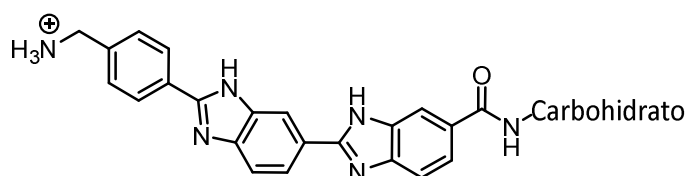


Figura 1.20 Estructura general de los nuevos derivados para el estudio de la interacción carbohidrato - ADN

1.4. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es cuantificar la contribución de los carbohidratos a la interacción con el surco menor ADN y determinar si influyen en este proceso factores como la cooperatividad de enlace de hidrógeno o la quiralidad del carbohidrato.

Para ello, será necesario en primer lugar el diseño y síntesis de una serie de derivados glicosilados empleando el núcleo de bis(benzimidazol) como nuevo vector. En segundo lugar, será necesaria la caracterización del proceso de interacción de estos derivados

glicosilados con el surco menor del ADN, tanto a nivel termodinámico como estructural, para así establecer las bases moleculares de la interacción carbohidrato - ADN.

Por tanto, esta tesis se ha dividido en varios capítulos bien diferenciados cuyos objetivos específicos se detallan a continuación:

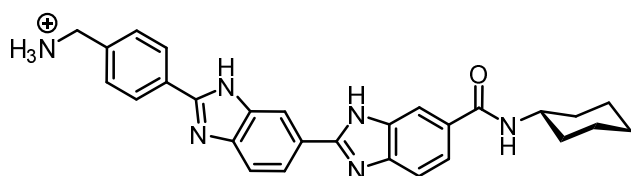
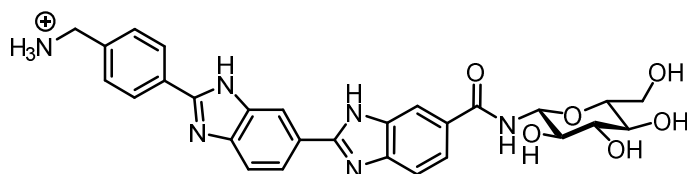
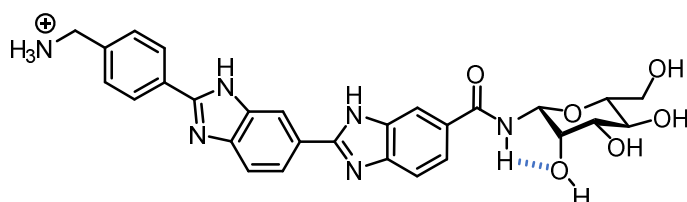
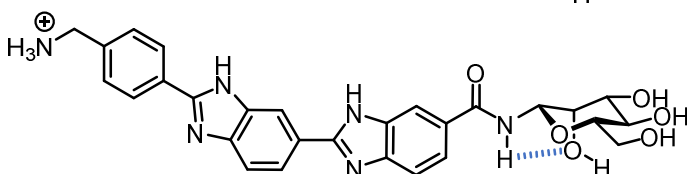
1.4.1. Objetivos del capítulo 2: Diseño y propiedades de ligandos glicosilados con vector derivado de bis(benzimidazol)

- Diseño de los derivados glicosilados del vector de bis(benzimidazol) que se pretenden estudiar.

Teniendo en cuenta el objetivo principal de la tesis, para poder conocer el aporte del carbohidrato, será necesario contar con un modelo con una forma y volumen similar a la de un carbohidrato, pero sin la presencia de grupos hidroxilo que puedan formar enlaces de hidrógeno con el ADN, en este caso un derivado de ciclohexilo **(1)**.

Para estudiar la posible influencia de la cooperatividad de enlace de hidrógeno se han seleccionado derivados de β -D-Glucosa **(2)**, que no tiene capacidad para generar un enlace de hidrógeno intramolecular y β -D-Manosa **(3)**, que si la tiene.

Para estudiar la posible influencia de la quiralidad, se ha seleccionado para su estudio un derivado de β -L-Manosa **(4)**

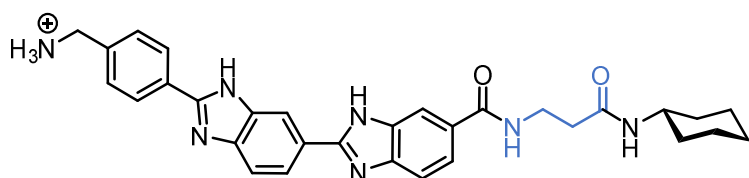
bis(benzimidazol)-Cy (**1**)bis(benzimidazol)-β-D-Glc (**2**)bis(benzimidazol)-β-D-Man (**3**)bis(benzimidazol)-β-L-Man (**4**)

- Estudio de las propiedades de estos derivados en su estado libre en disolución acuosa mediante diferentes técnicas biofísicas (UV, CD, RMN, ITC), centrado en el posible proceso de autoasociación que puedan presentar.
- Estudio de la interacción de estos ligandos con oligonucleótidos de ADN de secuencias concretas mediante dicroísmo circular y con polímeros de ADN mediante RMN (experimentos de STD).

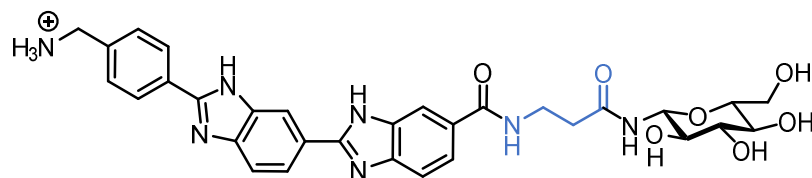
1.4.2. Objetivos del capítulo 3: Diseño y propiedades de ligandos glicosilados con vector derivado de bis(benzimidazol) y espaciador de β-Alanina

Según se ha observado en la interacción de los derivados anteriores con el ADN, el carbohidrato no ha sido capaz de introducirse en el interior del surco menor por problemas estéricos, y por tanto no pudo ejercer su interacción con las bases del ADN. Por tanto, los objetivos en este capítulo son:

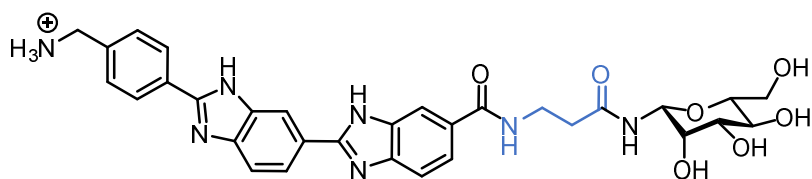
- Modificación del diseño de los ligandos mediante la introducción de un espaciador entre vector y carbohidrato que les otorgue flexibilidad: la β-Alanina.



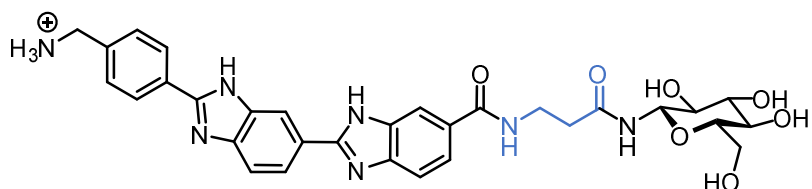
bis(benzimidazol)-β-Ala-Cy (5)



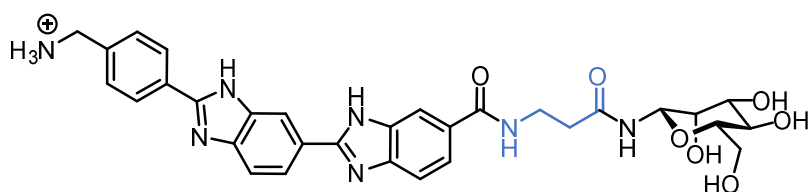
bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Glc (6)



bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Man (7)



bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Glc (8)



bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Man (9)

- Estudio de las propiedades de estos derivados en su estado libre en disolución acuosa mediante diferentes técnicas biofísicas (UV, CD, RMN). Comparación del proceso de autoasociación que presentan con los derivados de la familia anterior.
- Estudio de la interacción de estos ligandos con oligonucleótidos de ADN de secuencias concretas mediante dicroísmo circular y con polímeros de ADN mediante RMN (experimentos de STD). Comparación de resultados con los de la familia anterior.
- Cuantificación de la contribución a la interacción con el ADN de los carbohidratos en estos ligandos. Determinar si existe una contribución a la interacción por parte de la cooperatividad de enlace de hidrógeno y de la quiralidad del carbohidrato.

1.4.3. Objetivos del capítulo 4: Estudios de interacción con oligonucleótidos de ADN por RMN

- Conocer la ubicación del vector y del carbohidrato en el complejo formado con oligonucleótidos de ADN para caracterizar estructuralmente la interacción del azúcar con las bases del ADN.
- Elucidación estructural por RMN de un complejo formado por el ligando bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Manosa (**9**) con el oligonucleótido de secuencia 5'-CGCGAATTCGCG-3'.
- Elucidación estructural por RMN de un complejo formado por un ligando cuyo carbohidrato se encuentra uniformemente marcado con ^{13}C : bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa- $^{13}\text{C}_6$ (**10**) con el oligonucleótido de secuencia 5'-CGCGAATTCGCG-3'. Determinación de la posición del carbohidrato en el surco menor del oligonucleótido.

1.4.4. Objetivos del capítulo 5: Síntesis de ligandos del surco menor del ADN

En este capítulo se recoge toda la metodología de síntesis empleada para la obtención de los ligandos estudiados en esta tesis. Los objetivos particulares de este capítulo son:

- Optimizar la ruta sintética descrita para la obtención del vector de bis(benzimidazol), aumentando el rendimiento y acortando el tiempo de las etapas sintéticas.
- Síntesis de una primera generación de derivados glicosilados del vector de bis(benzimidazol) (**1 - 4**).
- Síntesis de una segunda generación de derivados glicosilados del vector de bis(benzimidazol) con β -Alanina (**5 - 10**).

Capítulo 2

DISEÑO Y PROPIEDADES DE LIGANDOS GLICOSILADOS CON VECTOR DERIVADO DE BIS(BENZIMIDAZOL)

2.1. Diseño de derivados glicosilados del vector de bis(benzimidazol)

El primer objetivo de este capítulo es el diseño de los derivados glicosilados del vector de bis(benzimidazol) que se pretenden estudiar. En base a los estudios realizados por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen,^{59,60} se ha seleccionado el vector con núcleo de bis(benzimidazol) para preparar nuestros derivados glicosilados (Figura 2.1). Como hemos comentado, el enlace amida es fundamental para el diseño del vector dado que es el encargado de iniciar la red de enlaces de hidrógeno intramolecular y direccional en el caso de la β -Manosa, haciendo a su hidroxilo en posición 2 un dador cooperativo en procesos intermoleculares.

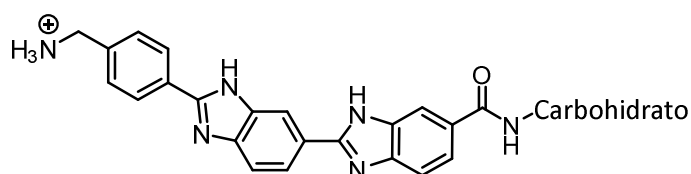


Figura 2.1 Estructura general de los derivados sintetizados

Para poder conocer la contribución del carbohidrato a la interacción, es necesario disponer de un modelo con una forma y volumen similar a la de un carbohidrato, pero sin la presencia de grupos hidroxilo que puedan actuar como aceptores y dadores de enlace de hidrógeno. Para ello, se ha preparado un derivado que sustituye el carbohidrato por un ciclohexilo (Figura 2.2). De esta forma disponemos de un derivado cuya interacción con el ADN únicamente puede establecerse por la acción del propio vector.

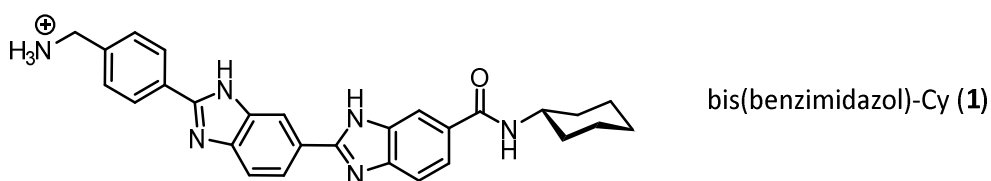


Figura 2.2 Derivado bis(benzimidazol)-Ciclohexilo (1)

Otro de los objetivos de esta Tesis es determinar si la cooperatividad de enlace de hidrógeno afecta al proceso de interacción con el ADN. En estudios previos del grupo de investigación, se ha podido detectar en medio acuoso la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular en derivados de β -Manosa, haciendo que su hidroxilo en posición 2 se comporte como dador cooperativo de enlace de hidrógeno.⁵¹ Como

modelo comparativo, se ha seleccionado para este estudio la Glucosa, pues al tener su hidroxilo 2 en posición ecuatorial, es incapaz de formar dicho enlace de hidrógeno intramolecular (Figura 2.3).

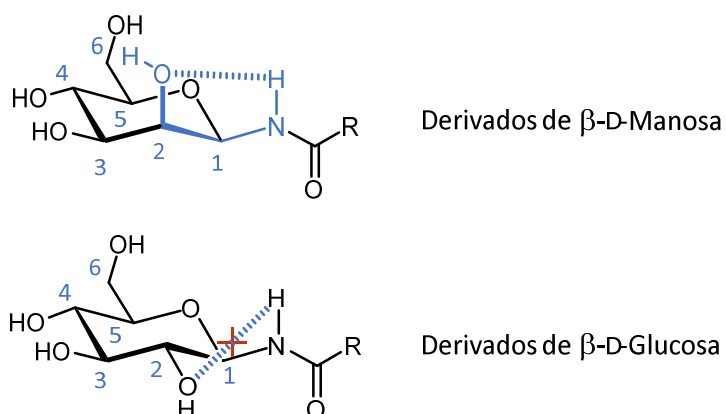


Figura 2.3 Enlace de hidrógeno intramolecular presente en derivados de β -Manosa

Por otro lado, también es interesante el estudio del efecto de la quiralidad del carbohidrato en los procesos de interacción, por lo que se va a explorar el comportamiento del derivado de β -L-Manosa (**4**) en su interacción con el ADN. Teniendo esto en cuenta, la Figura 2.4 muestra los distintos derivados glicosilados cuyas propiedades se van a estudiar en este capítulo.

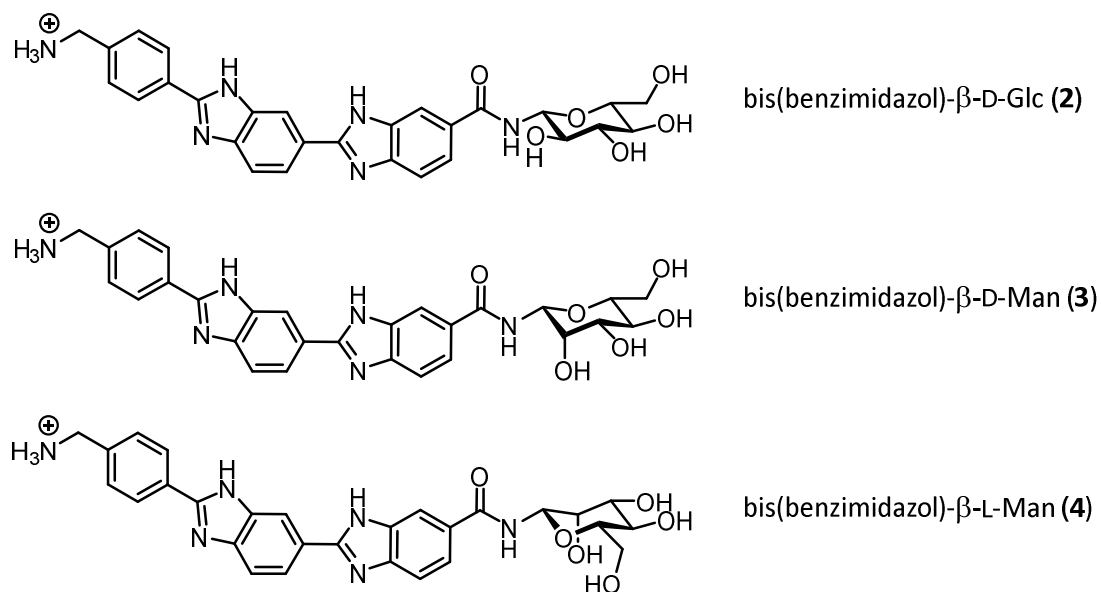


Figura 2.4 Derivados sintetizados para este estudio

Con esta selección de derivados glicosilados será posible determinar la contribución del azúcar a la interacción con el ADN, comparando la afinidad de los derivados glicosilados (**2 - 4**) con el derivado de ciclohexilo (**1**); la contribución del posible enlace

de hidrógeno intramolecular comparando la afinidad del derivado de β -D-Glucosa (**2**) con el de β -D-Manosa (**3**) y la influencia de la quiralidad comparando la afinidad de los derivados de D y L-Manosa (**3** y **4** respectivamente).

2.2. Propiedades en estado libre en medio acuoso: agregación

El primer paso para la caracterización de las propiedades de estos derivados en el estado libre es seleccionar unas condiciones experimentales adecuadas. En el caso de los derivados de Hoechst, es conocido que presentan cierta adsorción al cuarzo y al vidrio⁶² por lo que, para evitarla, es necesario tratar el instrumental de medida con un organopolisiloxano que lo recubra.

Para tener un control sobre el pH de las muestras, es necesario emplear una disolución reguladora. La elección de este tampón se realiza principalmente en función del pH en el que se quiere trabajar, pero también es necesario tener en cuenta otros aspectos en función de la técnica de medida que queramos emplear. En el estudio de la interacción con biomoléculas como el ADN, la disolución reguladora más empleada es el tampón fosfato salino, para recrear un medio similar al fisiológico. Sin embargo, en el caso particular de los derivados de Hoechst se ha descrito que son sensibles también a la entalpia de ionización de la disolución tampón, haciendo que el derivado se desprotona y precipite en el medio de disolución. Para evitar este fenómeno, se ha seleccionado como disolución reguladora de pH el ácido MOPS que ha sido empleado con éxito en la literatura.⁵⁸

En el caso de nuestros ligandos **1** - **4** hemos podido comprobar este comportamiento y se ha observado cómo los derivados precipitan al cabo de unos 30 minutos en disolución acuosa empleando tampón fosfato, mientras que empleando el tampón MOPS, los derivados permanecen en disolución durante más de 24 horas. Por tanto, el tampón MOPS es adecuado para la realización de los experimentos de agregación por ultravioleta y dicroísmo circular.

2.2.1. Estudio de la agregación por UV y CD

Dado que es conocido que el Hoechst y sus derivados presentan procesos de agregación (estudiados y caracterizados),⁵⁸ es de prever que nuestros derivados también los presenten. Para estudiar este fenómeno, se van a realizar experimentos de

dilución por diferentes técnicas, así como experimentos de temperatura variable a diferentes concentraciones.

El primer paso, al tratarse de moléculas que contienen grupos cromóforos, ha sido la caracterización de las propiedades de absorción de luz UV y el cálculo del coeficiente de extinción molar (ϵ) de los derivados **1** - **4**. En la Figura 2.5, se muestra el experimento de dilución por UV del derivado **2**, a modo de ejemplo. En este experimento, el máximo de las bandas de absorción no se desplaza con la concentración y hay un muy buen ajuste a una recta de la banda a 336 nm. Por tanto, se ha podido calcular el coeficiente de extinción molar (ϵ) de todos los derivados y se ha obtenido como valor $36900 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ realizando la media aritmética entre ellos.

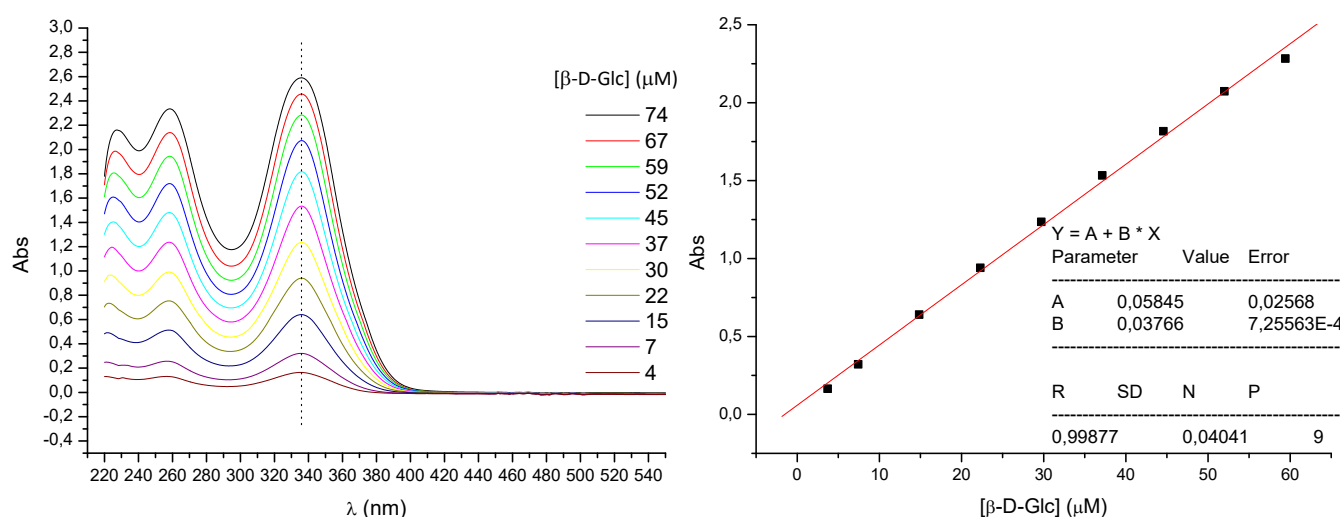
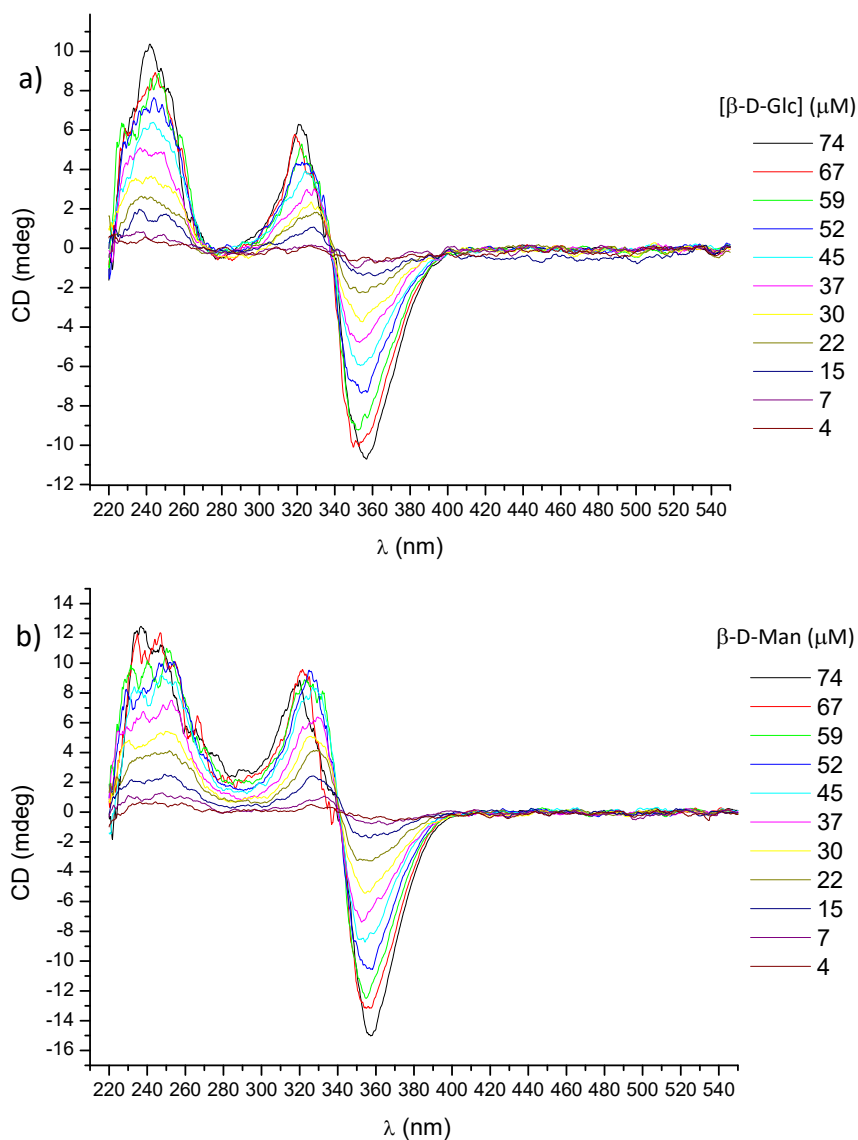


Figura 2.5 Experimento de dilución por UV del derivado bis(benzimidazol)- β -D-Glucosa (**2**) en agua a 25°C y su ajuste a la ecuación de una recta para $\lambda = 336 \text{ nm}$

Según los experimentos por UV, no habría indicios de procesos de autoasociación al no observarse desplazamiento de las bandas de absorción ni encontrarse ningún punto isobéptico. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que exista un proceso de autoasociación, por lo que es necesario recurrir a otras técnicas biofísicas para detectar si sucede esta agregación. El dicroísmo circular determina la diferencia en la absorción de la luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda y se relaciona tanto con la actividad óptica como con la dispersión óptica rotatoria. Esta técnica permite realizar un análisis conformacional de moléculas ópticamente activas y puede emplearse para el estudio de formación de agregados.

Al realizar experimentos de dilución por CD, se observó cómo en todos los casos aparece una banda de doble signo que se corresponde con la banda de absorción observada en UV a 340 nm (Figura 2.6). Este fenómeno se conoce como acoplamiento excitónico y tiene lugar cuando dos cromóforos muy similares se encuentran próximos en el espacio e indica, en este caso, que está teniendo lugar un proceso de autoasociación.⁶³



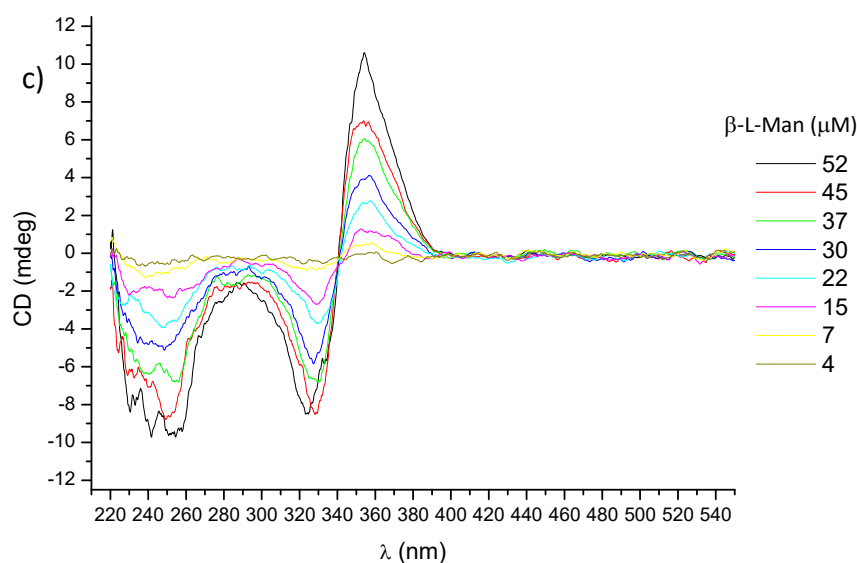
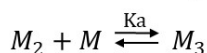
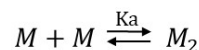


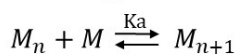
Figura 2.6 Experimentos de dilución por CD a 25 °C en agua de los derivados de a) β -D-Glucosa (2), b) β -D-Manosa (3) y c) β -L-Manosa (4)

Para determinar si el mecanismo de autoasociación es isodésmico o cooperativo, se realizaron experimentos de temperatura variable por dicroísmo circular.⁶⁴ El proceso isodésmico presenta una misma constante de asociación (K_a) para cada adición de monómero, mientras que en el proceso cooperativo está iniciado por una etapa de activación (K_n) seguida de una de crecimiento (K_a).

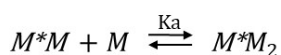
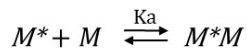
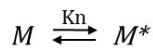
Isodésmico:



...



Cooperativo:



...

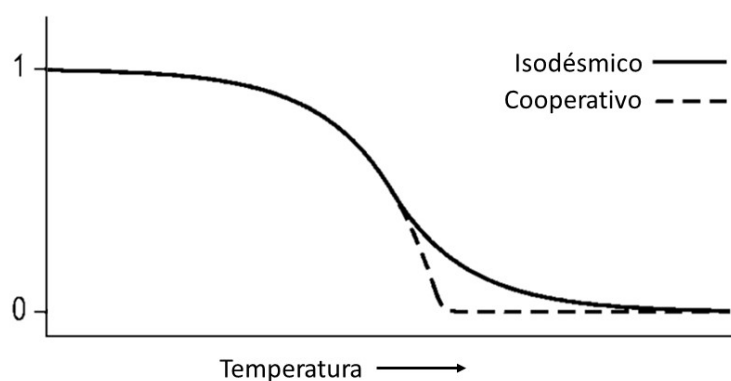
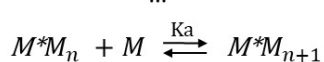


Figura 2.7 Representación esquemática del grado de agregación con la temperatura⁶⁴

En cuanto al grado de agregación, en el proceso isodésmico se va produciendo gradualmente, mientras que en el modo cooperativo no hay agregación hasta que no

tiene lugar previamente la etapa de activación, momento tras el cual el agregado crecerá más rápidamente (Figura 2.7).

En nuestro caso, se ha seguido la variación del dicroísmo circular con la temperatura del derivado de β -D-Glucosa (**2**). Como se puede observar en la Figura 2.8, al aumentar la temperatura disminuye la intensidad de la banda de doble signo en torno a 340 nm hasta prácticamente desaparecer, indicando que el agregado se rompe a altas temperaturas.

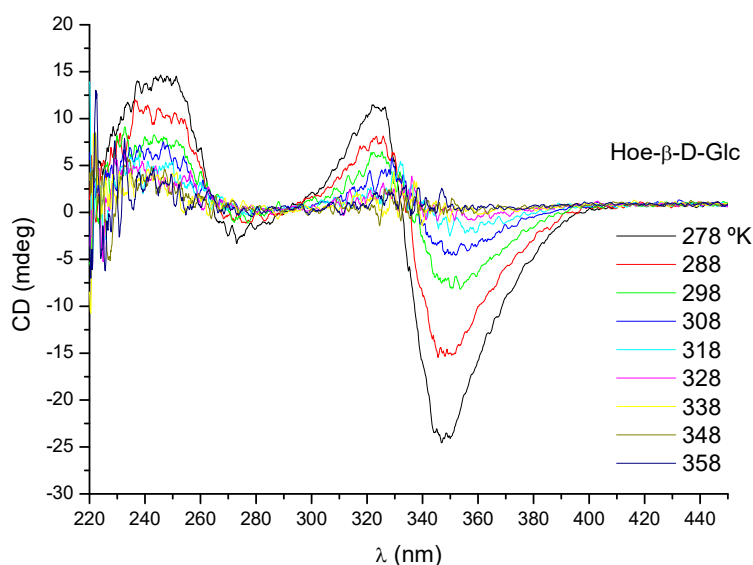


Figura 2.8 Espectros de dicroísmo circular a diferentes temperaturas del derivado de β -D-Glucosa (**2**) a una concentración de 70 μ M en agua y tampón MOPS

Para poder determinar el mecanismo de autoasociación de estos derivados, se ha seguido la variación de la intensidad de la banda negativa que presenta el derivado de β -D-Glucosa (**2**) en dicroísmo circular (350 nm) al variar la concentración. Tal como se muestra en la Figura 2.9, aunque no se haya podido completar la forma sigmoidea de la curva al abarcarse todo el rango de temperaturas posible, este mecanismo se corresponde con un modelo isodésmico.

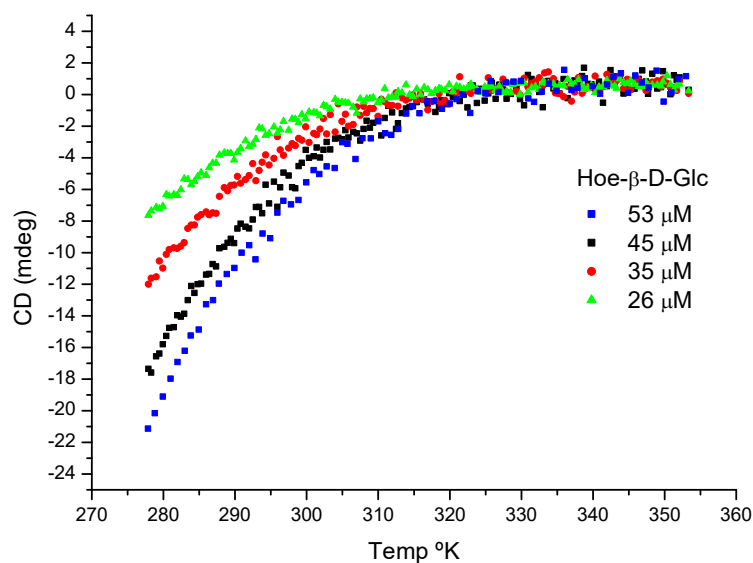


Figura 2.9 Variación de la intensidad con la temperatura de la banda negativa de CD a 350 nm a diferentes concentraciones del derivado de β -D-Glucosa (**2**) en agua y tampón MOPS

Por tanto, aunque no sea detectable por UV, los derivados **1** - **4** presentan una agregación en disolución acuosa que se ha podido estudiar por CD y que sigue un mecanismo isodésmico.

2.2.2. Estudio de la agregación por RMN

El estudio de la conformación y agregación de los ligandos libres, se ha completado por resonancia magnética nuclear. En el caso de los nuevos compuestos derivados de bis(benzimidazol) **1** - **4** estudiados en esta tesis, al realizar un primer espectro de RMN en agua, se pudo comprobar cómo sus resonancias se encontraban muy ensanchadas y poco definidas (Figura 2.10 espectro a).

La anchura de línea es inversamente proporcional al tiempo de relajación transversal (T_2). Las moléculas orgánicas pequeñas tienen tiempos T_2 largos y por tanto la anchura de sus líneas es pequeña. Por otro lado, las macromoléculas de alto peso molecular tienen tiempos de relajación transversal cortos y sus resonancias se ensanchan mucho, llegando incluso a desaparecer. Por tanto, si una molécula orgánica pequeña presenta este tipo de resonancias tan ensanchadas es debido a que su tiempo de relajación transversal se ha acortado, indicando que su tamaño es mayor, es decir, se encuentra formando un agregado. Además, a pH = 7 todas las resonancias se encuentran más apantalladas que a pH = 1.22 (Figura 2.10), especialmente en la parte aromática, probablemente debido a interacciones $\pi - \pi$ intermoleculares.

En el caso del derivado de β -D-Manosa (**3**), el agregado formado puede romperse al acidificar el medio, haciendo que los benzimidazoles de su estructura se protonen y repelan. De esta forma, las resonancias de los protones se afinan y definen, como puede observarse en la Figura 2.10, hasta que a pH 1.22 solo se observa monómero.

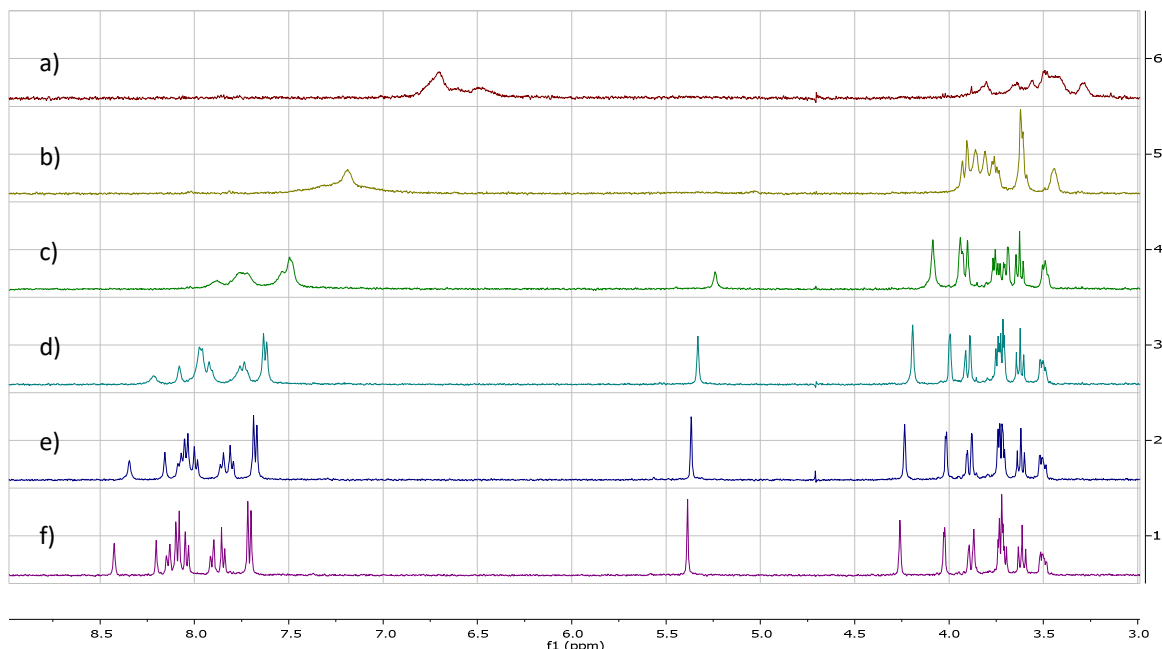


Figura 2.10 Espectro de RMN en agua del derivado de β -D-Manosa (**3**) a una concentración de 0.5 mM a 25°C y diferentes pH: a) pH = 7.03, b) pH = 2.69, c), pH = 1.92, d) pH = 1.65, e) pH = 1.43, f) pH = 1.22

La agregación también influye en el coeficiente de difusión (D) de una molécula, por lo que otra manera de afrontar el estudio de la agregación de compuestos orgánicos por RMN es a través del experimento DOSY (*Diffusion-Ordered Spectroscopy*). El DOSY es un experimento bidimensional que consiste en una secuencia de experimentos ^1H -RMN con variaciones sucesivas de un gradiente externo de campo magnético. Este gradiente provoca una atenuación de las resonancias de los protones de la molécula en disolución en función de la distancia que se alejen de su posición inicial durante el experimento. Esta técnica permite además identificar de forma separada diversos compuestos presentes en una misma muestra.

Tras su procesado, los experimentos DOSY se presentan como un experimento bidimensional. En el eje X se muestra el desplazamiento químico y en el eje Y el coeficiente de difusión.

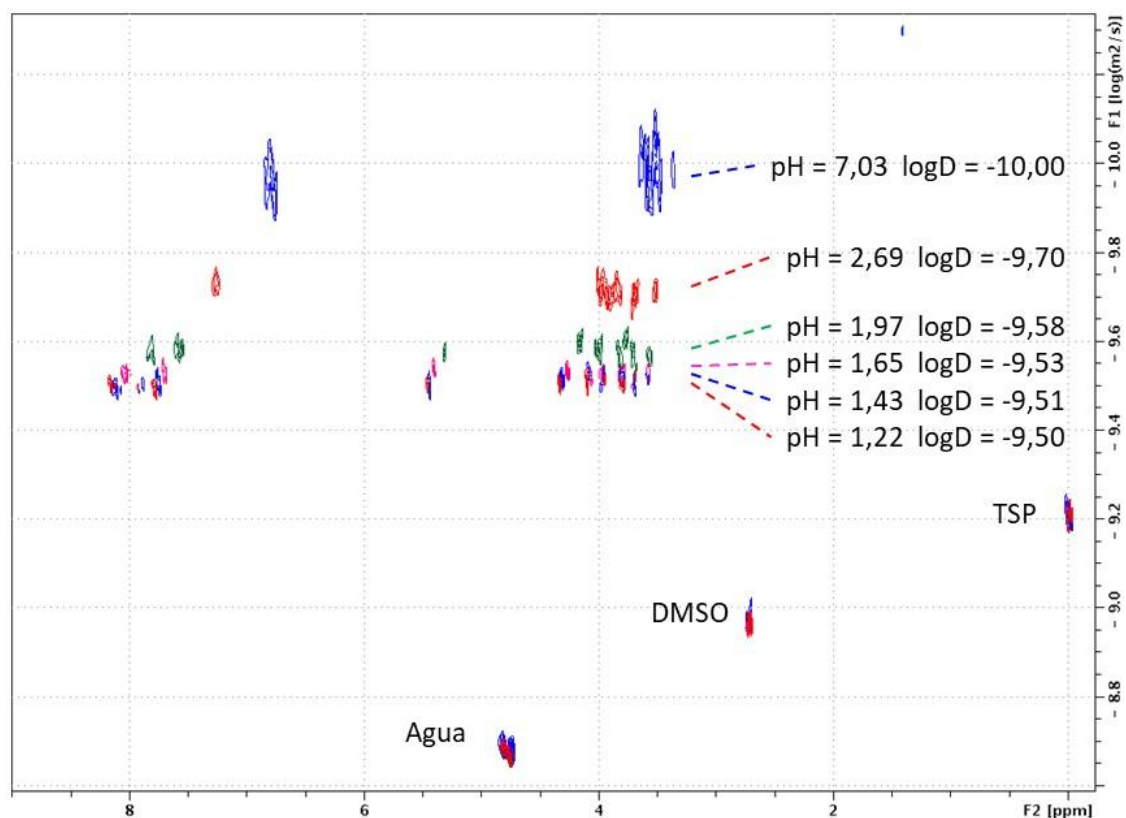


Figura 2.11 Espectros 2D-DOSYs obtenidos para el derivado de β -D-Manosa (**3**) (0.5 mM) en agua a distintos pH. Se incluyó en la muestra DMSO y TSP como referencias internas

En este caso, se ha realizado el estudio del derivado de β -D-Manosa (**3**) en agua con tampón MOPS, empleando DMSO y TSP como referencias internas. Tal como se muestra en la Figura 2.11, se obtuvieron los espectros 2D-DOSY a distintos pH del derivado de β -D-Manosa (**3**). El coeficiente de difusión obtenido a cada pH es muy distinto, pasando de $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ a pH 7 a $3.16 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ a pH 1.22, tres veces mayor. Estos coeficientes de difusión obtenidos es necesario compararlos con una recta de calibración que relacione coeficientes de difusión con los pesos moleculares de moléculas similares en tamaño y forma. En este caso, se ha optado por realizar esta comparación con una serie de derivados de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc)_n.

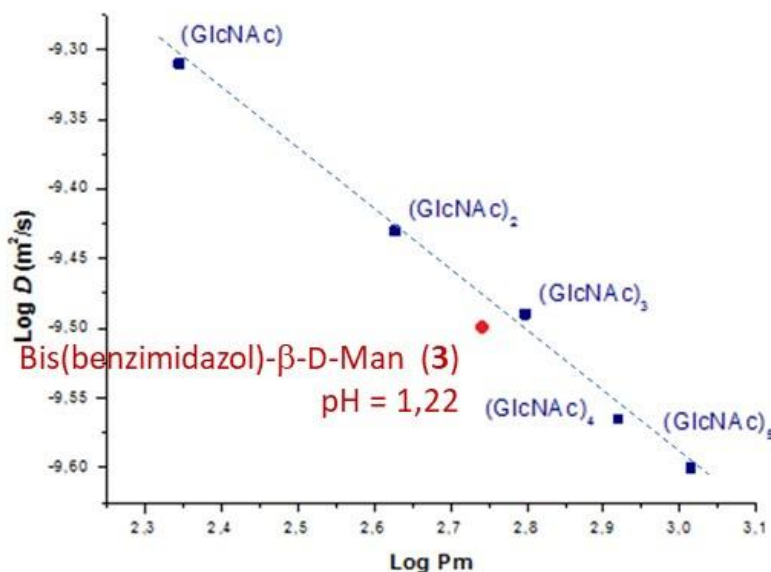


Figura 2.12 Gráfica de calibrado de coeficientes de difusión y pesos moleculares de derivados de (GlcNAc)_n

Como se puede observar en la Figura 2.12, el derivado de β-D-Manosa (**3**) a pH 1.22 se encuentra próximo en coeficiente de difusión y peso molecular al trisacárido (GlcNAc)₃ por lo que puede decirse que, a este valor de pH, se encuentra como monómero. El valor del coeficiente de difusión a pH 7 se encuentra muy alejado de este calibrado y se encuentra más cercano al valor del coeficiente de difusión de un péptido pequeño.

2.2.3. Estudios preliminares de agregación por ITC

La calorimetría (ITC, por sus siglas en inglés *Isothermal Titration Calorimetry*) es una técnica de gran valor para el estudio de cualquier tipo de proceso de interacción, ya sea macromolécula-ligando como procesos de autoasociación. La técnica mide directamente el calor absorbido o liberado por cualquier proceso de interacción, permitiendo conocer los parámetros termodinámicos que lo rigen. En nuestro caso, llevando a cabo un experimento de dilución, es posible determinar la constante de asociación del proceso de autoasociación.

Los experimentos de ITC que se presentan a continuación se realizaron en colaboración con el Prof. Niklaas Buurma y la Dr. Andrea Taladriz en la universidad de Cardiff. El grupo de investigación del Prof. Buurma ha desarrollado un programa de análisis propio para el análisis de sistemas complejos.⁶⁵ Los datos mostrados a

continuación han sido analizados con Microcal PEAQ-ITC Analysis Software a partir de los datos en bruto.

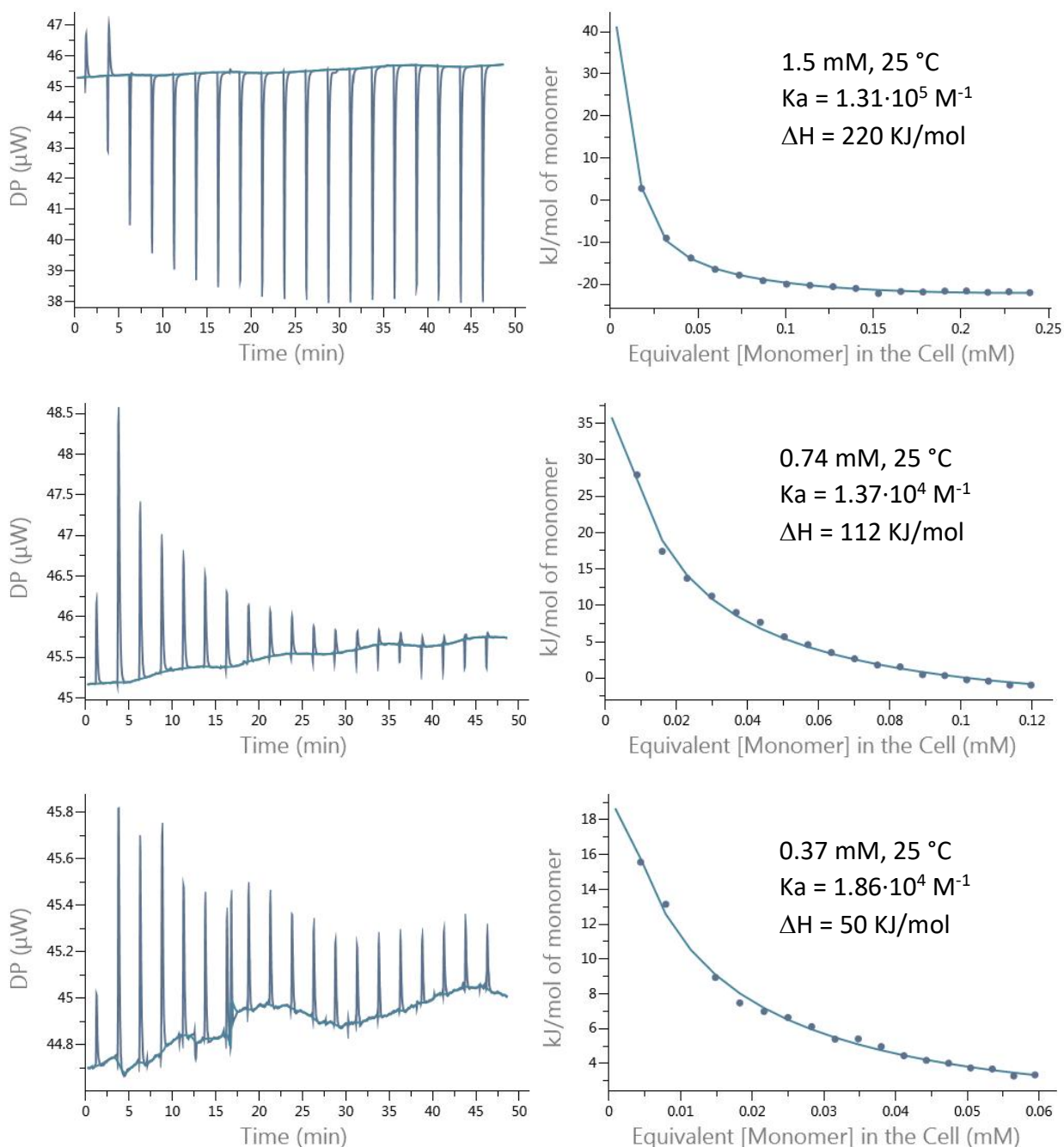


Figura 2.13 Termogramas obtenidos en los experimentos de dilución del derivado de β -D-Glucosa (**2**) a 25 °C en tampón MOPS comenzando desde diferentes concentraciones: a) 1.5 mM, b) 0.74 mM y c) 0.37 mM

En los termogramas obtenidos en los experimentos de dilución del derivado de β -D-Glucosa (**2**), los datos se ajustan a un modelo de autoasociación isodésmico (Figura 2.13), lo que está de acuerdo con lo observado en los experimentos de temperatura variable por dicroísmo circular.

Los resultados obtenidos son aun preliminares, pero permiten extraer de ellos una conclusión: la cinética de este proceso de autoasociación es rápida pues se alcanza muy pronto el estado de equilibrio tras cada inyección. Este hecho hace posible su cuantificación por esta técnica, tal y como se ha realizado en la literatura para el Hoechst 33258.⁵⁸ El mismo experimento llevado a cabo con los anteriores derivados de oligoamidas catiónicas estudiados por el grupo, revelaron que el proceso de autoasociación que sufrían era muy lento, lo que dificultaba enormemente su estudio mediante esta técnica.⁵³ Por tanto, podemos concluir que el nuevo diseño del vector ha cumplido su objetivo en este sentido.

2.3. Estudios de interacción por dicroísmo circular

El paso siguiente es estudiar la capacidad de unión de los derivados sintetizados **1 - 4** a oligonucleótidos de ADN. El primer objetivo de este apartado es determinar si el vector diseñado es adecuado para cuantificar el aporte de los carbohidratos a la interacción, es decir, si es capaz de unirse al surco menor del ADN y acercar al carbohidrato hasta el interior del mismo.

Para evaluar esta interacción y poner a punto los experimentos, se van a realizar valoraciones por dicroísmo circular con oligonucleótidos de secuencias concretas. El dicroísmo circular es una técnica en la cual la quiralidad es imprescindible. Muchos de los ligandos del ADN son aquirales y, por tanto, ópticamente inactivos, sin embargo, una vez interaccionan con el ADN, los ligandos adquieren un dicroísmo circular inducido (ICD) a través del acoplamiento de su momento de transición eléctrico con el de las bases del ADN. La observación de un dicroísmo circular inducido en la banda de absorción de un ligando aquiral es indicativo de que existe una interacción ligando - ADN.

Una de las razones por las que se ha escogido esta técnica es que se espera que la constante de asociación de los derivados **1 - 4** sea de un orden de magnitud similar a la que presenta el Hoechst 33258, dada su semejanza estructural. Hay que destacar que no se conoce este dato para el derivado del Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen. El valor de la K_a de los derivados de Hoechst (en torno a $10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}$) hace que el rango de concentraciones en el que se trabaja en dicroísmo circular (en torno a $10 \text{ } \mu\text{M}$) sea adecuado para determinar estas constantes de asociación. Además, en la bibliografía se

han descrito experimentos de valoración entre el Hoechst y algunos oligonucleótidos de ADN,⁵⁷ por lo que podemos reproducir esas condiciones experimentales con nuestros ligandos.

Otra de las razones por las que se ha escogido emplear el dicroísmo circular es que el seguimiento de la interacción por esta técnica permite además conocer el modo de unión entre el ligando y el ADN, permitiendo distinguir si un ligando se une al surco menor, al surco mayor, se intercala entre las bases o si se une como dímero.⁶⁶ Esta información estructural adicional es muy relevante en nuestro caso, pues el objetivo de nuestro estudio es llevar los carbohidratos hasta el surco menor y obtener complejos de los que conseguir datos estructurales y termodinámicos.

Para poder emplear esta técnica, es necesario que las bandas de absorción de luz UV de los ligandos no solape con la banda de absorción del ADN. En los trabajos anteriores del grupo de investigación con ligandos glicosilados derivados de oligoamidas catiónicas,⁵³ no ha sido posible emplear esta técnica dado que en ellos sí que había un solapamiento entre su banda de absorción y la del ADN. En el caso de los derivados objeto de esta tesis, podemos observar que la banda en torno a 330 nm no solapa con la absorción del ADN (Figura 2.14), por lo que en dicroísmo circular la banda inducida que se forme tampoco solapará y se podrá seguir su evolución durante la valoración.

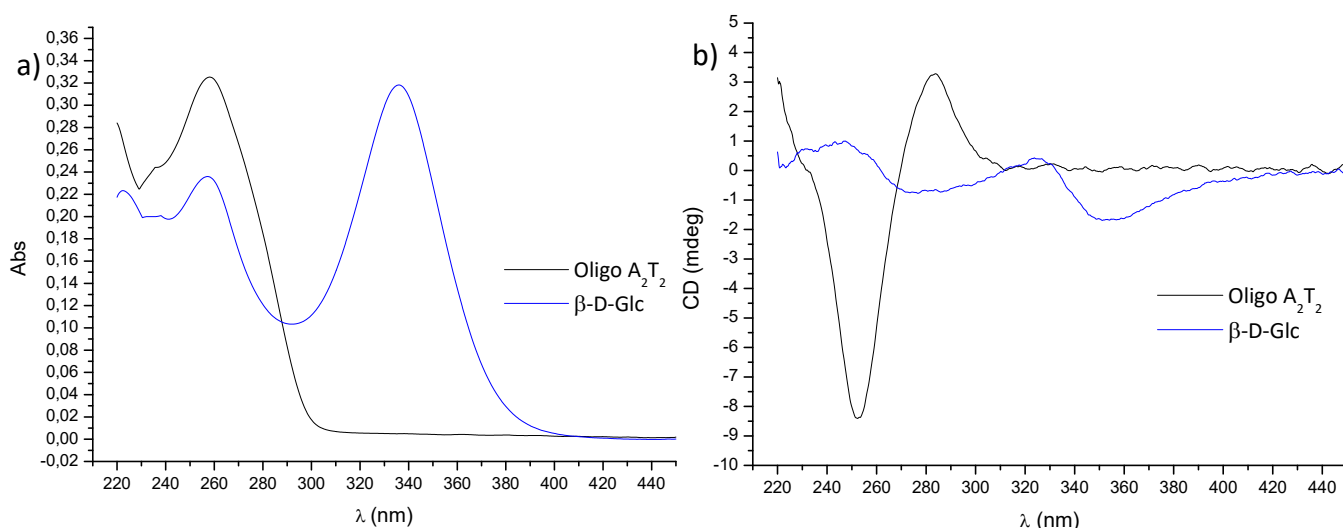


Figura 2.14 Espectros de a) UV y b) CD del oligonucleótido A₂T₂ y el derivado de β-D-Glucosa (2)

Se ha decidido emplear oligonucleótidos para este estudio porque de este modo podemos controlar la secuencia de pares de bases a la que se está uniendo el ligando y así evitar que haya más de un posible sitio de unión del ligando. De esta manera se

facilita el estudio estructural y termodinámico de los complejos, haciendo posible así nuestro objetivo de conocer la contribución del carbohidrato a la interacción. Las secuencias de oligonucleótidos que se han empleado para el estudio han sido:

- 5'-CGCGAATTCGCG-3' (que denominamos A₂T₂),: el dodecámero de Dickerson ha sido ampliamente utilizado en todo tipo de estudios de interacción sobre el ADN⁶⁷ y particularmente en estudios con el Hoechst.⁶⁸ Contiene la secuencia AATT, por la que se conoce que el Hoechst presenta una elevada afinidad.⁶⁹
- 5'-CGCAAATTTGCG-3' (que denominamos A₃T₃): empleado por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen en sus estudios sobre la interacción del análogo en el que se basa nuestro diseño.⁶⁰ Añade dos pares más de bases AT, aumentando así el número de centros aceptores de enlace de hidrógeno disponibles en el surco menor.
- 5'-GCGTACGCAGCG-3' (que denominamos R13): empleado por el Prof. Buurma y el Prof. Haq como secuencia de ADN aleatoria en sus estudios de interacción del Hoechst 33258.⁵⁸ Esta secuencia se utiliza como modelo de ADN natural. Además, al estar formado por una mayor cantidad de bases GC, el surco menor de este oligonucleótido será más ancho que el de los anteriores.

2.3.1. Experimentos de valoración con los oligonucleótidos A₂T₂, A₃T₃ y R13

Para la realización de los experimentos de valoración, primero se registró un espectro de CD del ligando libre a una concentración de 8 μ M en disolución acuosa (tampón MOPS 25 mM, pH = 7.05, [NaCl] 200 mM) a 20 °C. Es necesario añadir cationes Na⁺ a la muestra para que la forma B del ADN sea estable. A continuación, se añadieron cantidades crecientes del oligonucleótido correspondiente manteniendo constante la concentración de ligando tras cada adición, registrando tras ello un espectro de dicroísmo circular. A la concentración de ligando de 8 μ M ya aparece una banda de doble signo en torno a 340 nm, indicando la presencia de agregado.

En las valoraciones realizadas con las secuencias de oligonucleótidos A₂T₂ y A₃T₃, se observa la aparición de una banda de dicroísmo circular inducida por la formación del complejo (ICD) en torno a 340 nm, lo que quiere decir que los derivados están uniéndose al ADN (Figura 2.15, los experimentos con el oligonucleótido A₃T₃ se muestran en el Anexo). Es interesante comprobar cómo el agregado presente en el estado libre se

rompe para formar el complejo con los oligonucleótidos: la banda de doble signo correspondiente a la agregación del ligando desaparece para formar la banda positiva correspondiente al complejo. La banda que aparece es positiva y de una intensidad moderada (Figura 2.15), dentro del límite para considerar que se establece una interacción en el surco menor.⁶³ La intensidad de la banda formada por el complejo que contiene al derivado de ciclohexilo es mayor, lo que indica que este ligando consigue introducirse más en el interior del surco, probablemente debido a su menor volumen estérico.

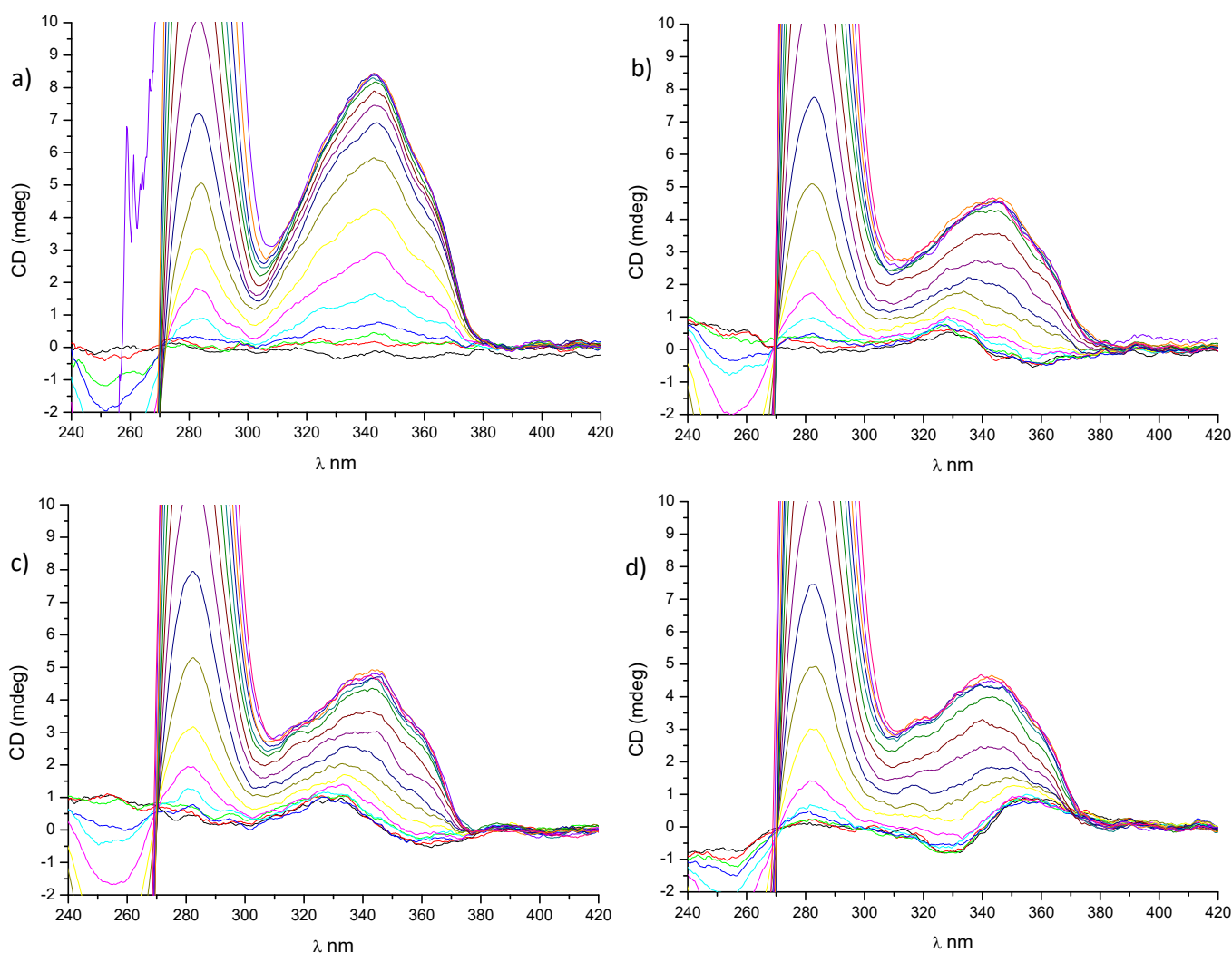


Figura 2.15 Experimentos de valoración por CD realizados con A₂T₂ con los diferentes derivados: a) bis(benzimidazol)-ciclohexilo (**1**), b) bis(benzimidazol)-β-D-Glc (**2**), c) bis(benzimidazol)-β-D-Man (**3**), d) bis(benzimidazol)-β-L-Man (**4**)

En cuanto a las valoraciones realizadas con el oligonucleótido R13, se observa un comportamiento distinto (Figura 2.16). En este caso la banda de dicroísmo circular inducido que aparece es de doble signo para los derivados **2**, **3** y **4**, fenómeno que se da

cuando tiene lugar un acoplamiento excitónico e indica que el ligando está interaccionando con el ADN como dímero.⁶³ La excepción a este comportamiento se observa en la interacción del derivado de ciclohexilo (**1**), que muestra una banda de un único signo y positiva, aunque de intensidad muy baja, lo que hace pensar que en este caso se trata de un complejo con estequiometría 1:1. En este último caso, es muy posible que el ligando no esté llegando hasta el interior del surco.

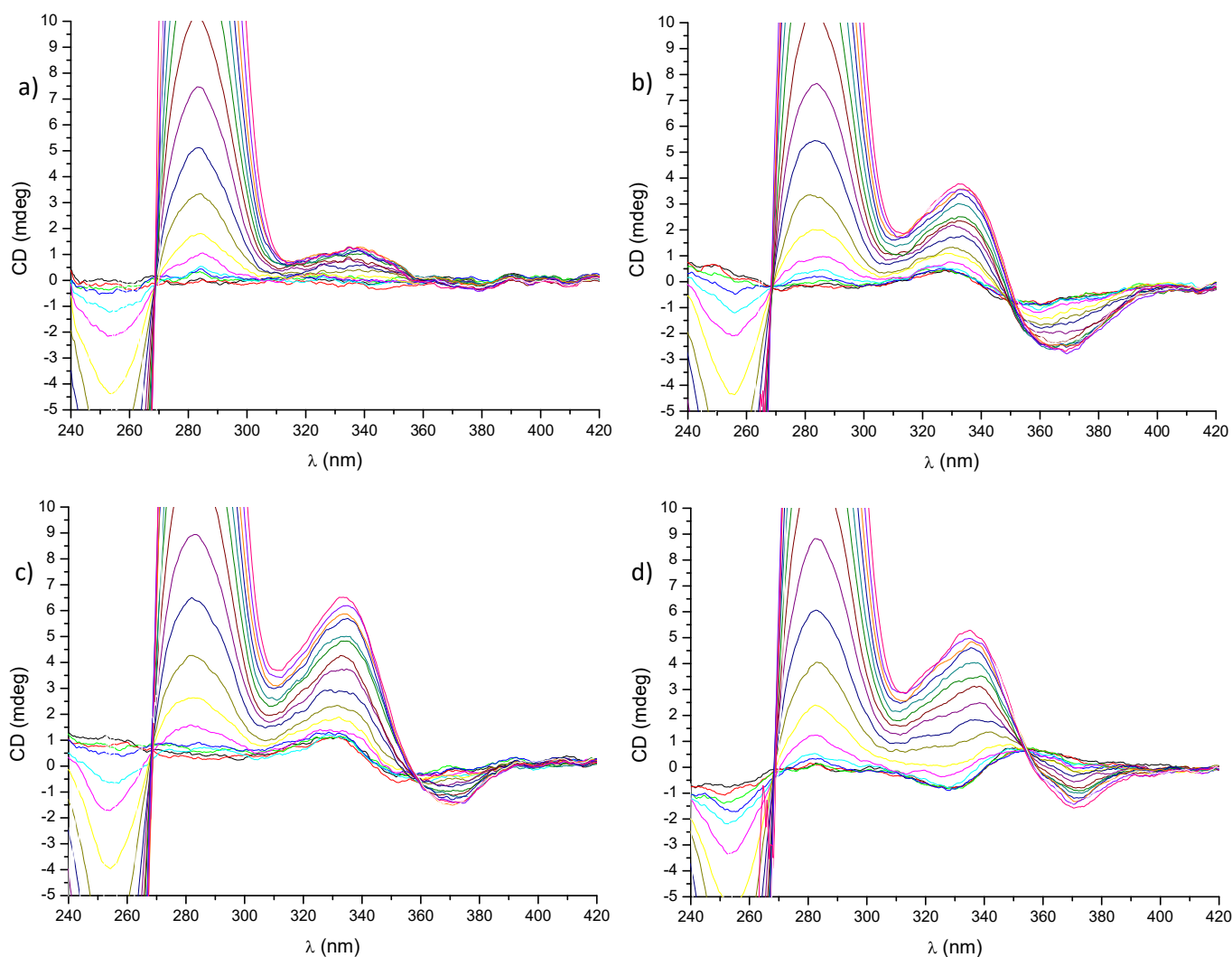


Figura 2.16 Experimentos de valoración por CD realizados con R13 con los diferentes derivados: a) bis(benzimidazol)-ciclohexilo (**1**), b) bis(benzimidazol)- β -D-Glc (**2**), c) bis(benzimidazol)- β -D-Man (**3**), d) bis(benzimidazol)- β -L-Man (**4**)

Gracias a estos experimentos de valoración, podemos afirmar que los derivados estudiados son ligandos del ADN e interaccionan con su surco menor. Además, su estequiometría de unión es dependiente de la secuencia de las bases del ADN, tal como ocurre con el Hoechst.⁵⁷

2.3.2. Estequiometría de los complejos con los oligonucleótidos A₂T₂, A₃T₃ y R13

Aunque los experimentos de valoración por dicroísmo circular ya aportan mucha información acerca de la estequiometría de unión de los ligandos (**1** - **4**) a cada oligonucleótido, es necesario realizar un experimento adicional para determinar con exactitud el número de moléculas de ligando que forman el complejo. Para ello, se va a emplear el método de variación continua o método de Job (también conocido como *Job Plot* en inglés).

Este método consiste en la medida de cualquier señal analítica (en nuestro caso el dicroísmo circular) en función de la cantidad de complejo formado, representando esta variación frente a la fracción molar de ligando en cada punto. La suma de las concentraciones de totales de ADN y ligando se ha de mantener siempre constante durante todo el experimento.

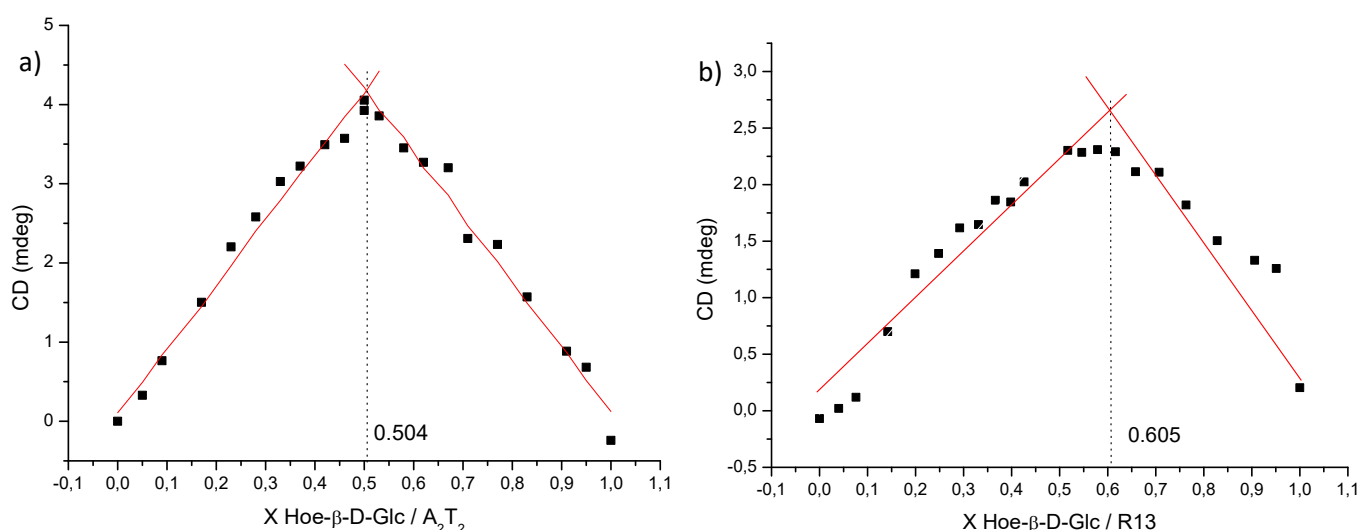


Figura 2.17 *Job Plots* obtenidos para los complejos de los derivados de β-D-Glucosa (**2**) con los oligonucleótidos a) A₂T₂ y b) R13

En estos experimentos se ha seguido la variación de la intensidad de la banda de dicroísmo circular inducida en torno a 340 nm. Como se puede observar en la Figura 2.17, para los complejos formados con el oligonucleótido A₂T₂, el máximo en la representación está próximo a la fracción molar de ligando de 0.5, lo que indica una estequiometría ligando/oligonucleótido 1:1 y corrobora lo observado durante la valoración, es decir, la aparición de una única banda positiva e intensa.

Para los complejos formados con el oligonucleótido R13, el máximo en la representación se acerca más a 0.66, formando así un complejo de estequiometría ligando/oligonucleótido 2:1, hecho que de nuevo se corresponde con lo observado en la valoración, la aparición de una banda de doble signo.

2.3.3. Cálculo de las constantes de asociación de los complejos formados con A₂T₂, A₃T₃ y R13

A partir de los datos obtenidos en los experimentos de valoración por CD, es posible obtener sus isothermas de unión y sus constantes de afinidad a través del ajuste a un modelo adecuado.⁶⁶ Considerando un proceso de asociación sencillo entre un ligando (L) y el sitio de unión al ADN, para formar el complejo ADN-ligando (C), se obtiene el equilibrio:



Asumiendo que el ADN no contribuye a la intensidad de la señal observada (I_{obs}), la señal se puede describir como intensidad de la señal de ligando libre (I_{free}) más la intensidad de la señal de ligando unido al complejo (I_{bound}) en función de sus respectivas concentraciones:

$$I_{obs} = I_{free}([L]_T - [L]_{bound}) + I_{bound} [L]_{bound}$$

Ecuación 2.1

Donde $[L]_T$ es la concentración de ligando total y $[L]_{bound}$ es la concentración de ligando unido al ADN. De esta ecuación se puede despejar $[L]_{bound}$ obteniendo:

$$[L]_{bound} = \frac{I_{obs} - I_{free}[L]_T}{I_{bound} - I_{obs}} = \frac{I_{obs} - I_{free}[L]}{\Delta I_{bound}}$$

Ecuación 2.2

El valor ΔI_{bound} sería el valor máximo de intensidad de señal que se alcanza cuando se ha formado todo el complejo posible. En el equilibrio, las concentraciones de ligando libre y ADN libre se definen como:

$$\begin{aligned} [L]_{free} &= [L]_T - x \\ [ADN]_{free} &= [ADN]_T - x \end{aligned}$$

Ecuación 2.3

Donde $[L]_{\text{free}}$ es la concentración de ligando libre, $[ADN]_{\text{free}}$ es la concentración de ADN libre y $x = [L]_{\text{bound}}$, la cantidad de ligando que está formando el complejo. Por tanto, la constante de asociación (K) de asociación puede escribirse como:

$$K = \frac{x}{[L]_{\text{free}}[ADN]_{\text{free}}} = \frac{x}{([L]_T - x)([ADN]_T - x)}$$

Ecuación 2.4

A partir de esta expresión, la interacción del ligando con el ADN puede describirse por la siguiente ecuación:

$$Kx^2 - x(K[ADN]_T + K[L]_T + 1) + K[ADN]_T[L]_T = 0$$

Ecuación 2.5

Despejando x como una ecuación de segundo grado quedaría la siguiente expresión:

$$x = \frac{(1 + K[L]_T + K[ADN]_T) - \sqrt{(1 + K[L]_T + K[ADN]_T)^2 - 4K^2[L]_T[ADN]_T}}{2K}$$

Ecuación 2.6

Como hemos dicho anteriormente, $x = [L]_{\text{bound}}$, por lo que podemos combinar esta ecuación con la Ecuación 2.2:

$$\frac{I_{\text{obs}} - I_{\text{free}}[L]}{\Delta I_{\text{bound}}} = \frac{(1 + K[L]_T + K[ADN]_T) - \sqrt{(1 + K[L]_T + K[ADN]_T)^2 - 4K^2[L]_T[ADN]_T}}{2K}$$

Ecuación 2.7

El siguiente paso es dejar la ecuación en función de I_{obs} , ya que es la señal que vamos a medir experimentalmente (la señal de dicroísmo circular inducido, en nuestro caso):

$$I_{\text{obs}} = I_{\text{free}}[L] + \Delta I_{\text{bound}} \left[\frac{(1 + K[L]_T + K[ADN]_T) - \sqrt{(1 + K[L]_T + K[ADN]_T)^2 - 4K^2[L]_T[ADN]_T}}{2K} \right]$$

Ecuación 2.8

Por último, en el caso de que el ADN presente más de un sitio de unión para el ligando, es necesario añadir un parámetro adicional (N), de forma que el número de sitios de unión presentes sea $[ADN]_T/N$. Por lo que finalmente, la expresión resultante es:

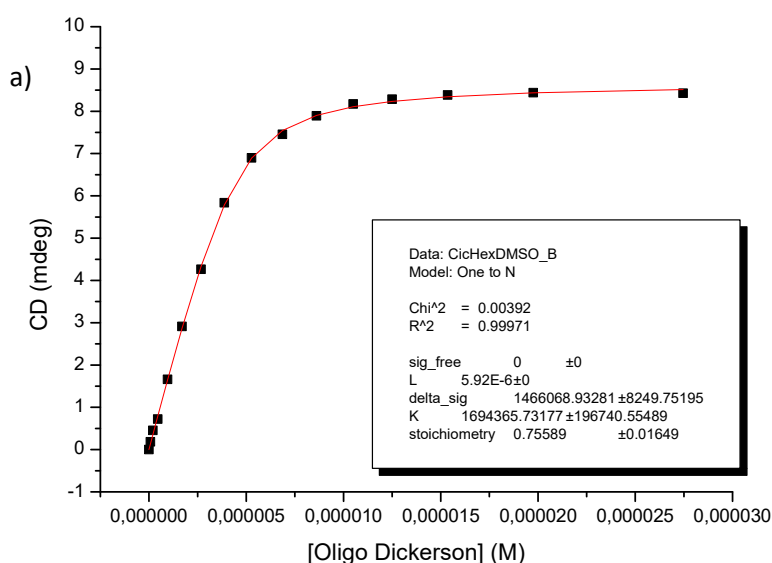
$$I_{obs} = I_{free}[L] + \Delta I_{bound} \left[\frac{\left(1 + K[L]_T + K \frac{[ADN]_T}{N}\right) - \sqrt{\left(1 + K[L]_T + K \frac{[ADN]_T}{N}\right)^2 - 4K^2[L]_T \frac{[ADN]_T}{N}}}{2K} \right]$$

Ecuación 2.9

De la

Ecuación 2.9 se pueden controlar y medir varios parámetros durante las valoraciones. La variable, en nuestro caso, sería la concentración total de ADN añadida en cada punto $[ADN]_T$, que es un parámetro conocido que podemos ir controlando. La concentración total de ligando, $[L]_T$, es conocida también y es constante en todos los puntos de la valoración, así como el valor de su intensidad de señal antes de comenzar la valoración (I_{free}).

Por tanto, el ajuste de la isoterma de unión a esta ecuación nos permitirá calcular el valor de la constante de asociación (K), de cada uno de los ligandos a cada secuencia de oligonucleótido. En todos los casos, se ha obtenido un muy buen ajuste de los datos a esta ecuación, como se muestra a continuación (Figura 2.18). Tampoco se observa en estas representaciones la posible influencia de la agregación.



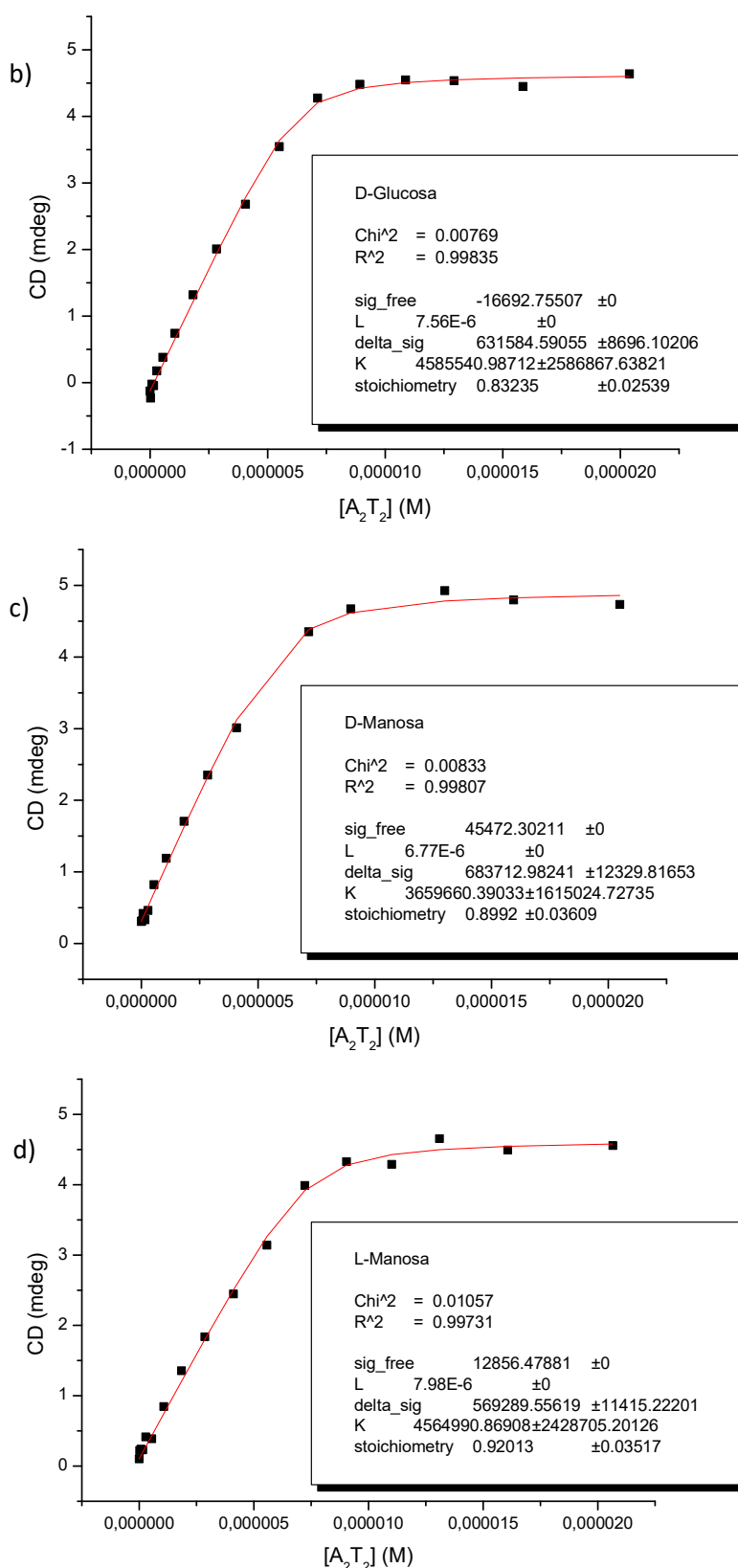


Figura 2.18 Ajuste de las isothermas de unión para las valoraciones con A_2T_2 y los ligandos derivados de: a) Ciclohexilo (1), b) β -D-Glucosa (2), c) β -D-Manosa (3) y d) β -L-Manosa (4)

Los valores de las constantes de asociación calculadas para todos los ligandos se recogen en la Tabla 2.1. para los complejos formados con A₂T₂ y A₃T₃. Como puede observarse, el derivado de ciclohexilo presenta una constante de asociación más baja que los derivados glicosilados, por lo que podemos afirmar que el carbohidrato tiene una contribución extra a la interacción con el ADN.

Ka (M ⁻¹)	Ciclohexilo (1)	D-Glc (2)	D-Man (3)	L-Man (4)	Hoechst
A ₂ T ₂	1.69·10 ⁶	4.59·10 ⁶	3.66·10 ⁶	4.56·10 ⁶	13.0·10 ⁶
A ₃ T ₃	0.81·10 ⁶	4.05·10 ⁶	2.28·10 ⁶	-	10.4·10 ⁶

Tabla 2.1 Constantes de asociación calculadas para la formación de cada complejo a partir de los experimentos de valoración con los oligonucleótidos A₂T₂ y A₃T₃

En el caso de la interacción con el oligonucleótido R13, las constantes de asociación obtenidas se muestran en la Tabla 2.2. La estequiometría de los complejos formados también se obtiene mediante el ajuste a la ecuación anterior y es muy diferente según el ligando: para el derivado de ciclohexilo es 1:1, para los derivados glicosilados es 2:1 y para el Hoechst es 4:1.⁵⁸ Este hecho hace que no sea posible la comparación de las Ka obtenidas.

Ka (M ⁻¹)	Ciclohexilo (1)	D-Glc (2)	D-Man (3)	L-Man (4)	Hoechst
R13	1.32·10 ⁶	0.11·10 ⁶	0.26·10 ⁶	0.17·10 ⁶	0.14·10 ⁶

Tabla 2.2 Constantes de asociación calculadas para la formación de cada complejo a partir de los experimentos de valoración con el oligonucleótido R13

Llama la atención el hecho de que las constantes de asociación para todos los derivados glicosilados (**2**, **3** y **4**) son muy similares entre sí para cada oligonucleótido, apenas hay diferencia en la afinidad del ligando cuando se cambia el azúcar. Teniendo en cuenta esta observación, cabe preguntarse qué tipo de interacción está estableciendo el carbohidrato con el ADN.

La información que nos da el dicróismo circular es acerca de los grupos cromóforos del ligando. En este caso, la banda de absorción que estamos analizando es la correspondiente al bis(benzimidazol) del vector, es decir, no se obtiene información estructural sobre el carbohidrato con estos experimentos.

La intensidad máxima de la señal de dicroísmo circular inducido (ICD) obtenido en la valoración, es un parámetro que también aporta información acerca del modo de unión del ligando. Los datos experimentales obtenidos para este máximo de ICD se muestran en la Tabla 2.3 y puede apreciarse que este valor para los ligandos glicosilados (**2**, **3** y **4**) es bastante más bajo que para el derivado de ciclohexilo (**1**) y el Hoechst.

ICD (mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Cy (1)	D-Glc (2)	D-Man (3)	L-Man (4)	Hoechst
A₂T₂	44.4	19.9	19.3	19.9	59.5
A₃T₃	57.4	29.4	27.6	-	67.1

Tabla 2.3 Valores de intensidad del máximo de ICD alcanzado en las valoraciones con los oligonucleótidos A₂T₂ y A₃T₃

La intensidad de este dicroísmo circular inducido depende de los siguientes parámetros.⁶³

$$ICD \approx \sin 2\beta \left(\frac{1}{\lambda_{ADN}} - \frac{1}{\lambda_{Lig}} \right)^{-1} r^{-2}$$

Ecuación 2.10

Donde β es el ángulo entre el momento de transición del ligando y las bases del ADN, λ_{ADN} y λ_{Lig} son las longitudes de onda del máximo de absorción del ADN y del ligando respectivamente y r es la distancia entre el ligando y las bases del ADN.

De todas estas variables, podemos asumir en nuestro caso que el ángulo con el que interaccionan todos los derivados estudiados es muy similar (al unirse todos al surco menor) y conocemos que todos los ligandos tienen el mismo valor de longitud de onda en su máximo de absorción. Por tanto, el único parámetro en el que pueden diferenciarse es la distancia entre el ligando y el ADN, lo que quiere decir que los derivados glicosilados (**2** - **4**) se encuentran más alejados del interior del surco menor que el derivado de ciclohexilo (**1**) y que el Hoechst.

Teniendo en cuenta toda esta información, podemos concluir que la parte aromática de los ligandos glicosilados establece su interacción con el surco menor del ADN. Sin embargo, parece probable que el carbohidrato no puede aproximarse al interior del surco para establecer su interacción, por este motivo no se aprecian diferencias significativas entre la interacción de los distintos azúcares.

2.4. Estudios de interacción por RMN: STD

El siguiente paso es poder determinar si efectivamente el carbohidrato está o no en el interior del surco menor. Para ello, será necesario realizar un estudio estructural más detallado por RMN, empleando experimentos de diferencia de transferencia de saturación (STD por sus siglas en inglés: *Saturation Transfer Difference*). Esta técnica ha sido utilizada ampliamente para estudiar complejos proteína - ligando, permitiendo determinar si hay o no asociación e incluso qué zonas del ligando se encuentran próximas a la proteína.

Esta técnica se basa en la saturación selectiva de diferentes residuos de una macromolécula, y por difusión de espín, se transfiere esta magnetización a todos los protones de la misma.^{70a-c} Si el ligando está próximo a la macromolécula, es decir, si hay interacción, esta magnetización también se transfiere a los protones más próximos del ligando. Si el equilibrio entre especie libre y asociada del ligando es rápido, esta transferencia de magnetización llega hasta el ligando en estado libre y su efecto puede observarse.

El experimento de STD se obtiene como como un espectro de diferencia, primero se realiza la saturación selectiva de protones de la macromolécula irradiando alguno de sus protones (*on-resonance*) y después se adquiere un segundo espectro irradiando una zona del espectro en la que no hay señales (*off-resonance*). El espectro final de STD se obtiene como la diferencia entre ambos espectros y únicamente contendrá las señales del ligando que hayan interaccionado con la macromolécula (Figura 2.19).

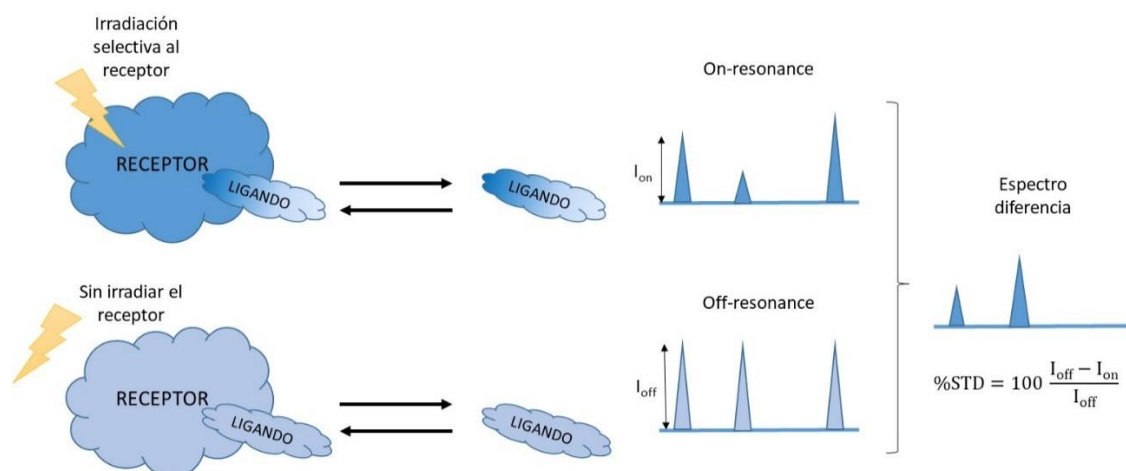


Figura 2.19 Representación esquemática del experimento de STD

En cuanto a la aplicación de esta técnica al estudio de ligandos del ADN, es importante tener algunos factores adicionales en cuenta. Gracias a la diferencia de las dimensiones horizontal y vertical del ADN, se genera una anisotropía en la eficiencia de la difusión de la saturación a lo largo de los dos ejes. Este efecto genera distintos resultados experimentales en función de región del ADN que se esté irradiando. Así, puede distinguirse entre distintos modos de unión: intercalación, unión al surco menor o interacción electrostática externa.^{70d}

La estructura del ADN es una doble hélice cuyo esqueleto está formado por desoxirribosas unidas mediante enlaces fosfodiéster. En el B-ADN, la localización espacial de los hidrógenos de las desoxirribosas siempre tiene lugar de la misma manera: el hidrógeno anomérico (H1') se encuentra próximo a la región interna del surco menor mientras que los hidrógenos H4', H5' y H5'' se orientan hacia el exterior del mismo (Figura 2.20). Este hecho se puede aprovechar para realizar experimentos de STD irradiando selectivamente la zona en la que aparecen estas resonancias, 5.6 ppm para H1' y 4.5 ppm para H4', H5' y H5''. Así, en nuestro grupo de investigación se ha optimizado un experimento de DF-STD (*Differential Frequency - STD*) para identificar ligandos del surco menor del ADN gracias a estas características estructurales. Se ha podido describir la orientación de distintos residuos de ligandos tipo glico-oligoamida en el surco menor de polímeros de ADN.⁵⁰

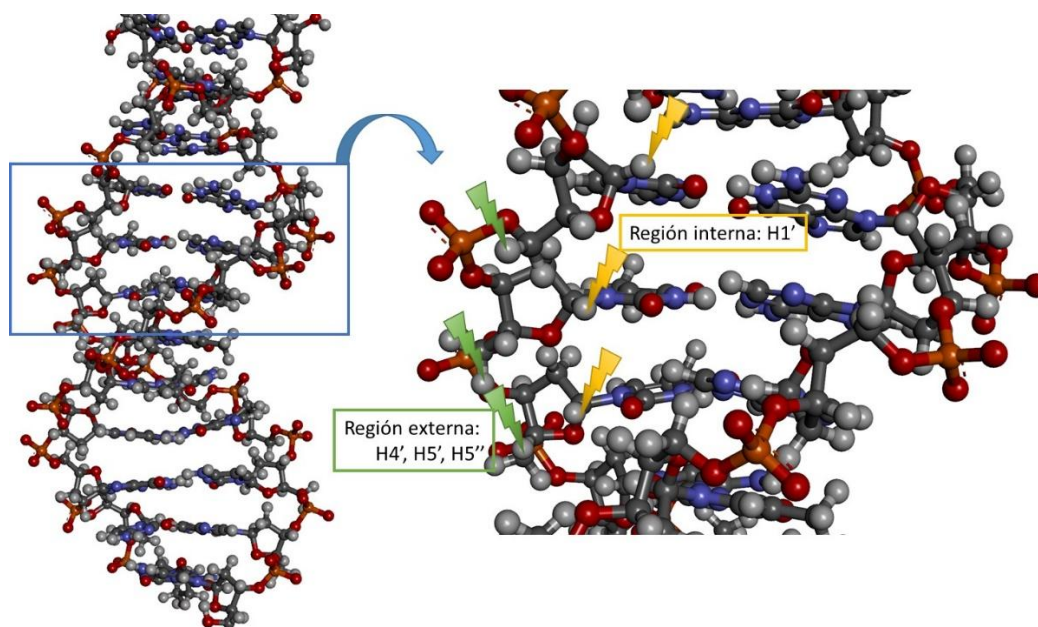


Figura 2.20 Estructura del ADN en la que se puede ver la disposición de los protones H1', H4', H5' y H5'' en el surco menor

Para poder emplear los experimentos de STD correctamente, al tratarse de una técnica basada en la observación del ligando, es necesario que sus resonancias estén lo mejor definidas posible. En nuestro caso la agregación que presentan los ligandos en estado libre hace que sus resonancias se ensanchen y pierdan definición (Figura 2.21 a). Este ensanchamiento es tal, que hace que estas resonancias se vean afectadas por las irradiaciones a 4.5 y 5.6 ppm. Así, en los experimentos de control realizados en ausencia de ADN (blancos de STD) la saturación recibida por el ligando era cercana al 100%, invalidando el experimento.

Para solucionar este problema y poner a punto el experimento con estos ligandos, se modificaron las condiciones experimentales para conseguir que haya la mayor cantidad posible de monómero en disolución. Estos cambios han consistido en elevar la temperatura de los experimentos y diluir la muestra. Como puede apreciarse en la Figura 2.21, se ha conseguido obtener un espectro del ligando lo suficientemente definido como para poder realizar los experimentos de STD.

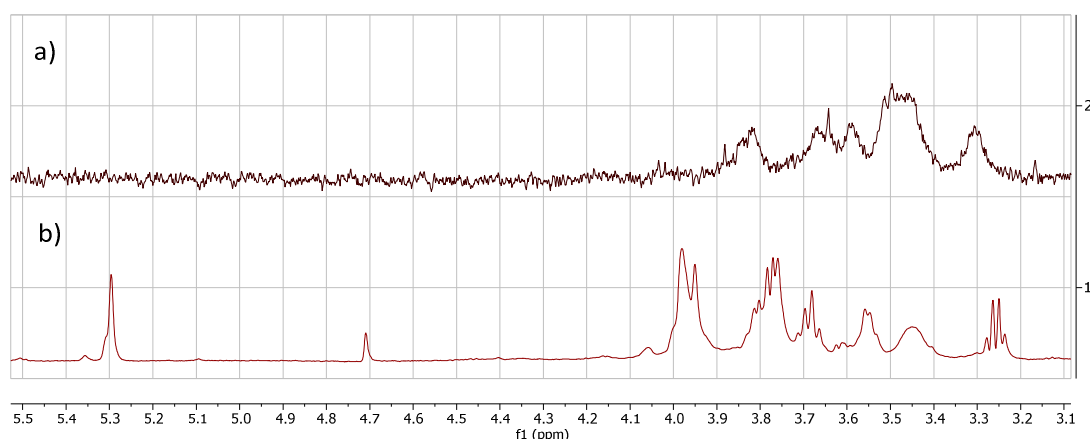


Figura 2.21 Ampliación del espectro de RMN en la zona de las resonancias del carbohidrato en agua del derivado de β -D-Man (**3**) en distintas condiciones: a) 500 μ M, 20°C, 500 MHz, b) 100 mM, 37°C, 600 MHz

Para comprobar que el ligando no recibía demasiada saturación en estas nuevas condiciones al irradiarlo en las dos zonas mencionadas, se realizaron de nuevo unos experimentos de blanco en ausencia de ADN. Esta saturación, en todos los casos, no llega a superar el 20%, (excepto el H1 anomérico) lo que supone una notable mejora y hace posible el uso del experimento para obtener información estructural.

Otro de los aspectos a tener en cuenta a la hora de realizar estos experimentos es la elección de la disolución tampón empleada para controlar el pH. En RMN, además de

tener en cuenta los parámetros habituales para elegir un buen regulador de pH (rango de pH, capacidad amortiguadora, variación con la temperatura, etc.), es necesario que, de tener resonancias, no solapen con las que queremos analizar. Como hemos visto, el tampón fosfato hace que estos ligandos precipiten en el medio en tiempos muy cortos, por lo que tampoco podemos utilizarlo en RMN.

El MOPS, que se ha empleado en los experimentos de dicroísmo circular, tampoco es adecuado pues sus resonancias solapan con las de nuestro ligando. Además, no está disponible comercialmente su forma deuterada. Finalmente, el compuesto seleccionado para emplearse como tampón ha sido el imidazol- d_4 . Su rango útil de pH está en torno a 7 y sus resonancias no solapan con la zona aromática de los ligandos. En las pruebas realizadas para comprobar si el ligando precipitaba con el tiempo, se vio que éste continuaba en disolución pasadas las 24 horas.

Los experimentos de STD se pusieron a punto empleando *ct*-DNA (ADN de timo bobino), con una relación molar ligando/ADN de 1/0.13 expresada en pares de bases ([L] = 100 μ M), en D_2O , tampón imidazol- d_4 a 37 °C. Los ligandos empleados para este estudio han sido los derivados de β -D-Glucosa (**2**, Figura 2.22) y β -D-Manosa (**3**, Figura 2.23). Como puede observarse en ambas figuras, la saturación llega a las resonancias del carbohidrato en ambas frecuencias de irradiación (4.5 y 5.6 ppm), lo que indica que, efectivamente, hay interacción.

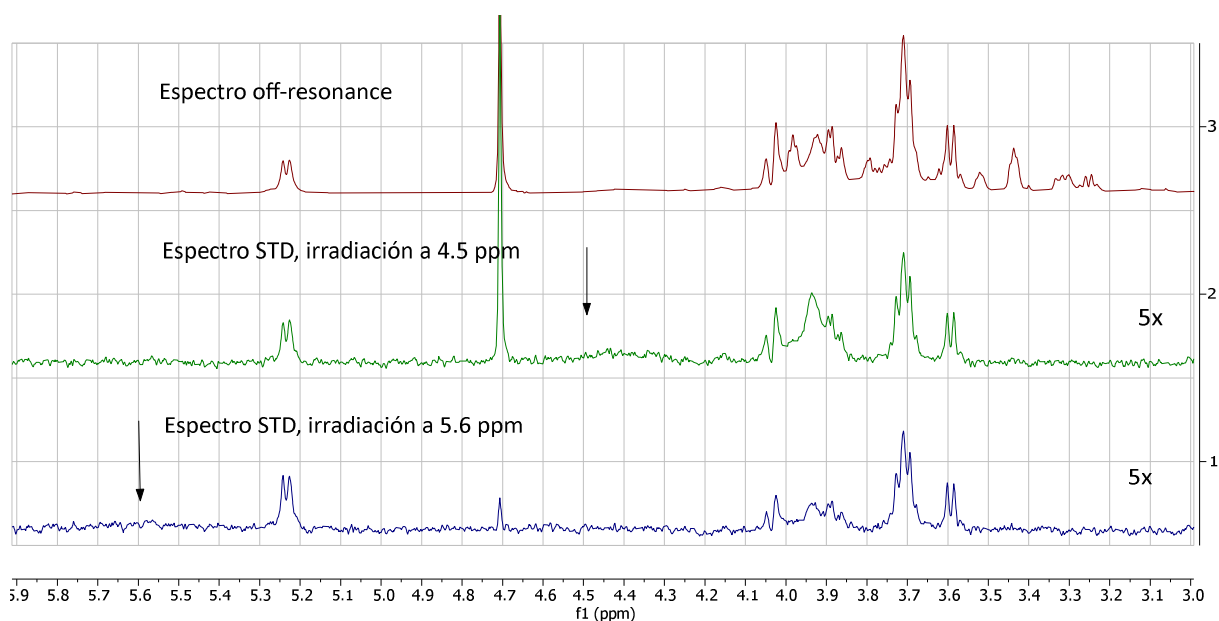


Figura 2.22 Ampliación de los espectros de STD en la zona de las resonancias del carbohidrato del complejo Hoechst- β -D-Glucosa (**2**) - *ct*-DNA en D_2O , tampón imidazol- d_4 a 37 °C

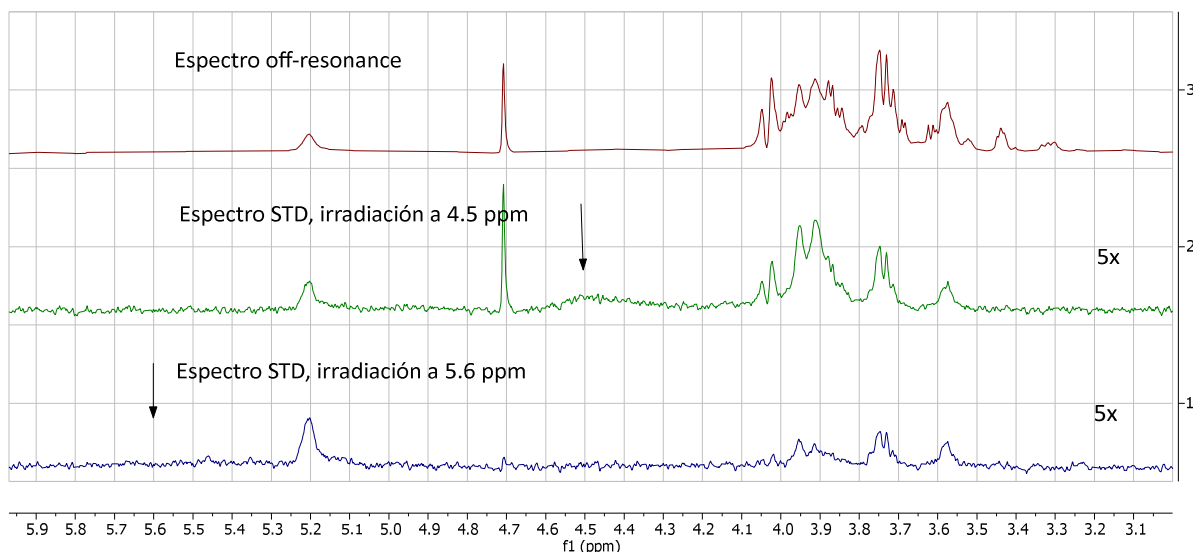


Figura 2.23 Ampliación de los espectros de STD en la zona de las resonancias del carbohidrato del complejo Hoechst- β -D-Manosa (**3**) - *ct*-DNA en D₂O, tampón imidazol-d₄ a 37 °C

A los valores de STD obtenidos para cada resonancia del carbohidrato del ligando es necesario restarle el valor de STD obtenido en el experimento de blanco (sin adición de ADN) para obtener el valor de STD real. Como puede observarse en la Tabla 2.4, el valor de STD obtenido es positivo, lo que es prueba de que hay interacción.

Sin embargo, este valor es muy reducido y similar en ambas irradiaciones, siendo en todos los casos inferior al 10%. Esto indica que el carbohidrato no se encuentra en el interior del surco menor.

% STD Bis(benzimidazol)- β -D-Glc (2) – <i>ct</i> -DNA								
	Irradiación	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H6'
Blanco	4,5ppm	23	7	7	7	6	14	20
	5,6ppm	30	4	4	4	4	5	5
13% <i>ct</i> -DNA	4,5ppm	25	13	13	13	14	24	23
	5,6ppm	39	12	12	12	13	8	8
Δ STD	4,5ppm	2	6	6	6	8	10	3
	5,6ppm	9	8	8	8	9	3	3

% STD Bis(benzimidazol)- β -D-Man (3) – ct-DNA								
	Irradiación	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H6'
Blanco	4,5ppm	18	13	12	9	22	13	10
	5,6ppm	37	3	7	5	6	4	9
13% ct-DNA	4,5ppm	25	21	13	10	22	13	12
	5,6ppm	39	9	11	10	9	7	11
Δ STD	4,5ppm	7	8	1	1	0	0	2
	5,6ppm	2	6	4	5	3	3	2

Tabla 2.4 Porcentaje de STD obtenido para cada protón del carbohidrato de los complejos de bis(benzimidazol)- β -D-Glucosa (2) y bis(benzimidazol)- β -D-Manosa (3) con ct-DNA

2.5. Conclusiones

Los derivados glicosilados de bis(benzimidazol) muestran procesos de autoasociación en medio acuoso que han podido ser observados y estudiados por distintas técnicas. Mediante dicroísmo circular, se ha podido conocer que este proceso de agregación es isodésmico y mediante ITC, que presenta una cinética rápida. Gracias a ello, este proceso de autoasociación podrá ser caracterizado por microcalorimetría en un futuro.

Se han puesto a punto experimentos de interacción con el ADN tanto por dicroísmo circular (oligonucleótidos) como por RMN (polímeros) para la caracterización de los complejos con los derivados **1** - **4**. El vector empleado es capaz de interaccionar con el surco menor del ADN por lo observado en dicroísmo circular.

Los ligandos estudiados presentan constantes de afinidad muy elevadas para la formación de complejos con los oligonucleótidos A₂T₂ y A₃T₃, en el orden de magnitud del Hoechst 33258 siendo, por tanto, muy buenos ligandos del ADN.

Por otro lado, los experimentos de STD muestran que el carbohidrato no es capaz de introducirse en el interior del surco menor del ADN. Por ello, será necesario realizar algún cambio estructural en el vector, para así poder abordar los estudios acerca del papel del carbohidrato en la interacción con el surco menor del ADN.

Capítulo 3

DISEÑO Y PROPIEDADES DE LIGANDOS GLICOSILADOS CON VECTOR DERIVADO DE BIS(BENZIMIDAZOL) Y ESPACIADOR DE β -ALANINA

3.1. Propuesta de nuevo diseño: espaciador de β -Alanina

El diseño presentado y estudiado en el capítulo anterior no permite un acercamiento del carbohidrato al interior del surco menor del ADN. Además, se pudo comprobar en los experimentos por dicroísmo circular, que el derivado de ciclohexilo (**1**) era capaz de introducirse más que los derivados glicosilados, lo que sugiere que el problema es causado por un impedimento estérico de los mismos.

En ese diseño, los carbohidratos están unidos al vector aromático directamente mediante un enlace amida, lo cual genera una estructura de poca movilidad. De esta manera, si el carbohidrato no estuviese en una posición favorable para introducirse dentro del surco, le sería muy difícil girar y poder adaptarse. Por ello, una posible solución sería añadir un espaciador entre el vector y el carbohidrato que le permita a este acomodarse y llegar a interactuar con las bases del ADN. Además, no interesa que el NH de la amida unida al bis(benzimidazol) esté participando de un enlace de hidrógeno intramolecular, pues en el derivado del Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen, este NH se encuentra interactuando con las bases del ADN.⁶⁰

El espaciador seleccionado debe ser sintéticamente fácil de introducir en la estructura del vector y además debe poder unir los carbohidratos mediante un enlace amida, ya que es necesario para la formación de redes cooperativas de enlaces de hidrógeno intramoleculares en derivados de β -Manosa. El espaciador debe ser lo suficientemente largo como para dar libertad de movimiento al carbohidrato, pero no lo bastante como para dejar al carbohidrato lejos del vector, fuera del surco del ADN.

La forma más sencilla para conseguir esto, es introducir dos átomos más de carbono, seguidos de otro grupo ácido que posteriormente dé lugar a la amida deseada por acoplamiento con los aminoazúcares correspondientes. Esto se puede conseguir acoplando la β -Alanina a la estructura del vector, como se muestra en la Figura 3.1.

Por otro lado, los trabajos del Prof. Gellman demostraron que, dependiendo del número de carbonos en la cadena de un aminoácido, los NH amídicos y los carbonilos de las amidas contiguas podían formar estructuras cíclicas estabilizadas por enlaces de hidrógeno intramoleculares.⁷¹ En el caso particular de la β -Alanina dichos enlaces no se forman, dando así libertad de giro al carbohidrato.

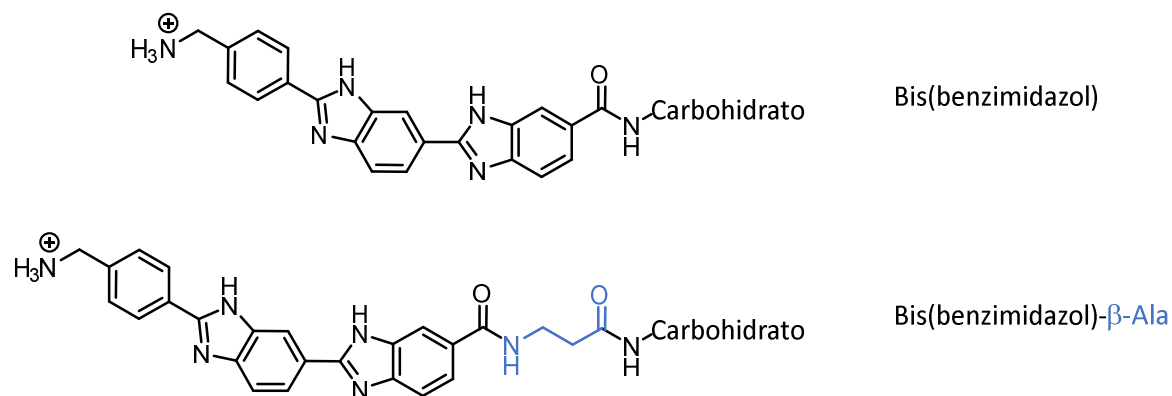


Figura 3.1 Vector derivado de bis(benzimidazol) original y vector con espaciador de β-Alanina

Gracias a este espaciador de β-Alanina, el carbohidrato tendrá libertad de movimiento y se conservará el grupo amida, permitiendo generar los enlaces de hidrógeno intramoleculares en los derivados de β-Manosa. Con esta nueva estructura se ha preparado una nueva familia de ligandos derivados de ciclohexilo (**5**), β-D-Glucosa (**6**), β-D-Manosa (**7**), β-L-Glucosa (**8**) y β-L-Manosa (**9**) que se muestran en la Figura 3.2.

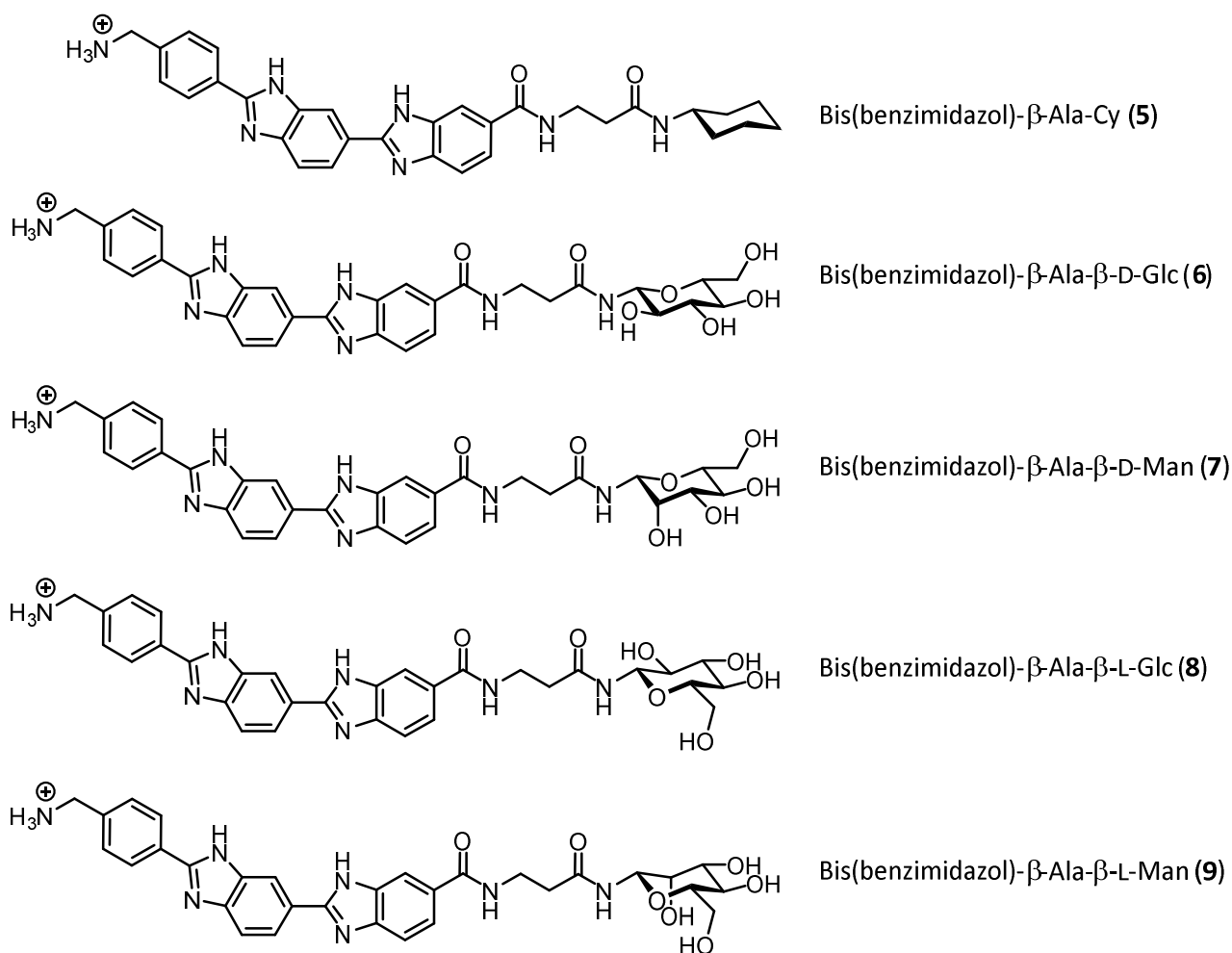


Figura 3.2 Nueva familia de derivados para el estudio de la interacción carbohidrato - ADN

3.2. Propiedades en estado libre en medio acuoso: agregación

Una vez se ha diseñado el nuevo vector con el espaciador de β -Alanina y preparado los distintos derivados (**5 - 9**), es necesario comprar sus propiedades en estado libre con las de los derivados de la primera generación (**1 - 4**) estudiadas en el capítulo anterior. Para ello se va a emplear la metodología puesta a punto y que se describió en el capítulo anterior, realizando experimentos de dicroísmo circular y RMN.

3.2.1. Estudio de la agregación por UV y CD

Al igual que se realizó con la primera generación de derivados **1 - 4**, el primer paso es caracterizar las propiedades de absorción de luz UV y el cálculo de los coeficientes de extinción molar (ϵ) de los nuevos compuestos **5 - 9**. El comportamiento para estos derivados es idéntico al mostrado por los derivados de la primera generación, como se puede observar en la Figura 3.3, donde se muestra como ejemplo el espectro de UV del derivado de β -D-Glucosa (**6**). El máximo de absorción no se desplaza al variar la concentración y su representación se ajusta muy bien a una recta. El coeficiente de extinción molar obtenido para estos derivados (**5 - 9**) es de $36500 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, prácticamente idéntico al obtenido para la familia anterior.

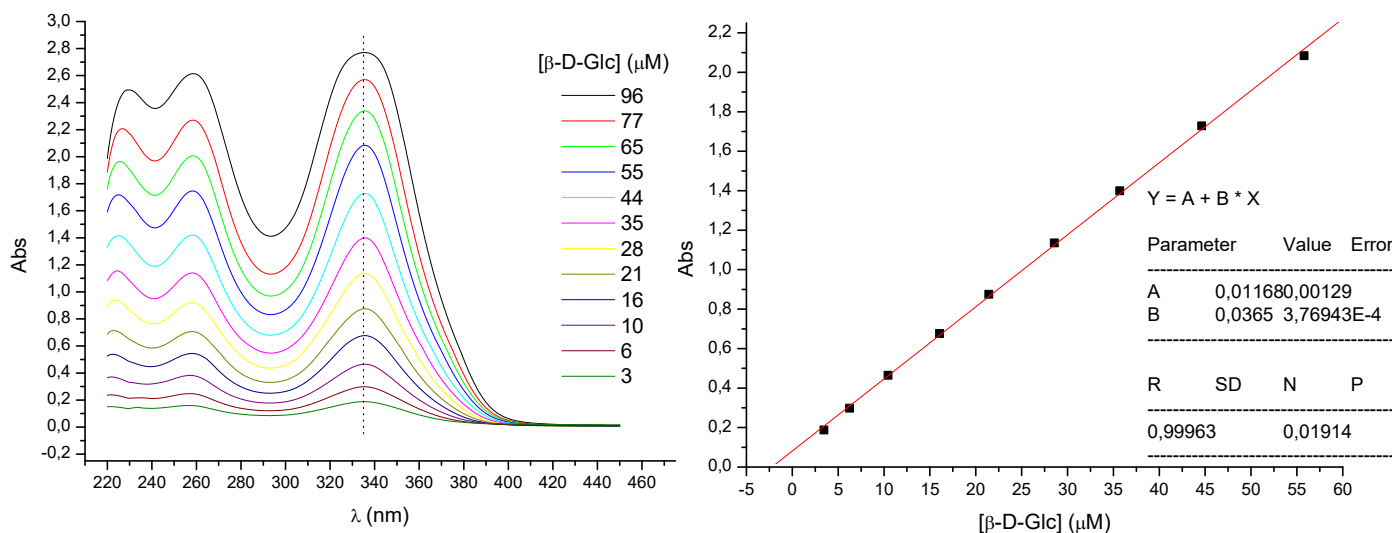


Figura 3.3 Experimento de dilución por UV del derivado de β -D-Glucosa (**6**) en agua a 25°C y su ajuste a la ecuación de una recta para $\lambda = 336 \text{ nm}$

Los experimentos de dilución por UV realizados tampoco muestran indicios de agregación, por lo que se realizaron de nuevo experimentos de dilución por CD al igual que con los derivados de la primera generación. Como puede comprobarse en la Figura

3.4, los derivados de la nueva familia también presentan una banda de doble signo en torno a 340 nm, indicando que también se produce agregación. Sin embargo, esta banda es menos intensa y, sobre todo, de orientación contraria a la de la familia anterior.

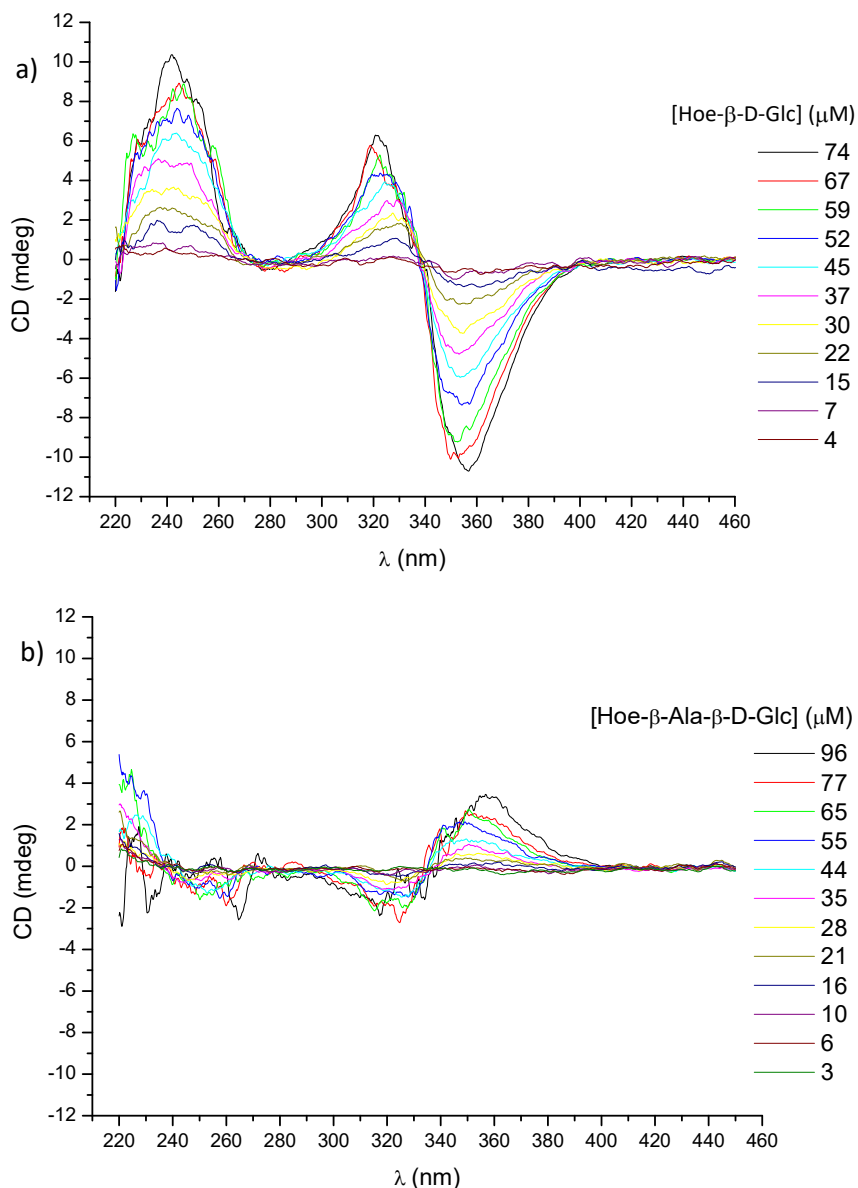


Figura 3.4 Espectros de dicroísmo circular a diferentes concentraciones de los derivados de β -D-Glucosa de ambas familias en agua a 25°C. a) derivado de bis(benzimidazol) (**2**), b) derivado de bis(benzimidazol)- β -Ala (**6**)

Cuando dos cromóforos son muy parecidos y están cerca uno del otro, pero no en el mismo plano, se produce un desdoblamiento excitónico que depende de la orientación relativa de los cromóforos y de la distancia entre ellos. De esta forma, el espectro de dicroísmo circular resultante cambia dependiendo su la disposición espacial relativa, es

decir, si los grupos cromóforos están apilados, en línea o a 90° uno del otro (Figura 3.5).⁷²

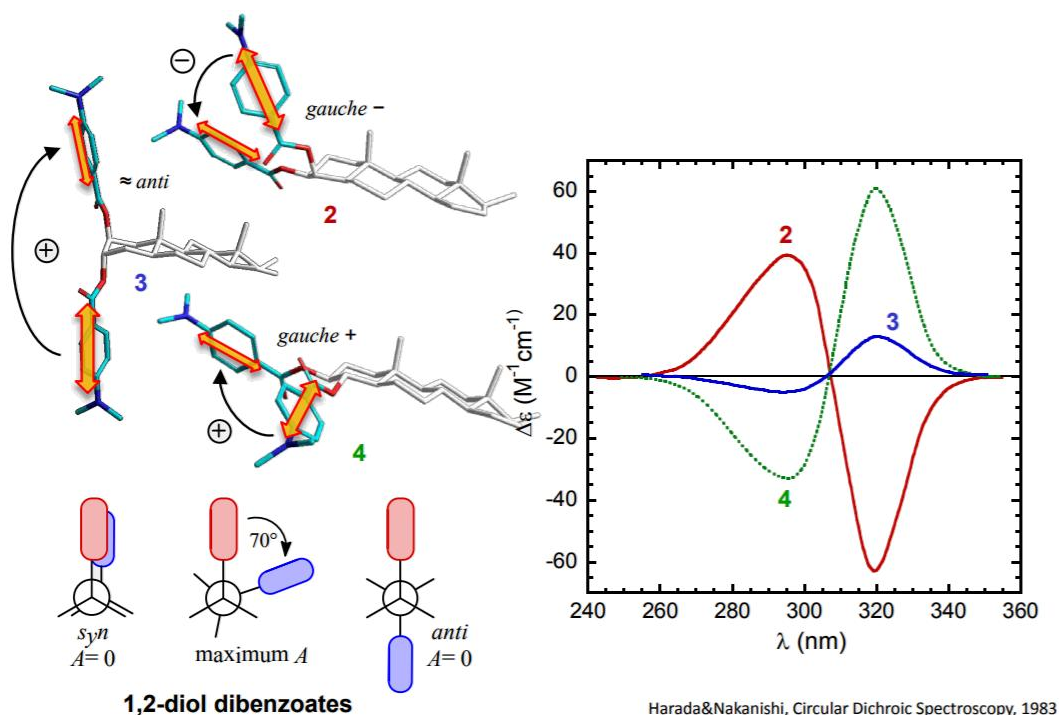


Figura 3.5 Cambio en el espectro de dicroísmo circular al variar la posición relativa de los grupos cromóforos⁷²

Por tanto, el cambio que se observa en el espectro de CD entre ambas familias de derivados sugiere que el modo en el que se orienta la parte aromática de los mismos al formar el complejo es distinto, indicando por tanto que se agregan de forma diferente. Al agregarse, los cromóforos de los nuevos derivados se disponen de manera más alejada intermolecularmente.

3.2.2. Estudio de la agregación por RMN

Para estudiar más en profundidad estos agregados, se va a emplear de nuevo la Resonancia Magnética Nuclear, tal como se hizo con los derivados de la anterior familia. En el espectro de ^1H -RMN (Figura 3.6) se puede comprobar cómo el derivado de β -D-Man (**7**) de la nueva familia presenta unas resonancias ligeramente más estrechas y definidas que el derivado de β -D-Man (**3**) de la primera generación. Además, la parte aromática se encuentra menos apantallada en el derivado de la nueva familia, indicando una menor presencia interacciones $\pi - \pi$ intermoleculares. Es decir, las partes aromáticas del nuevo vector se encuentran más alejadas en el agregado, tal y como se pudo comprobar también por dicroísmo circular.

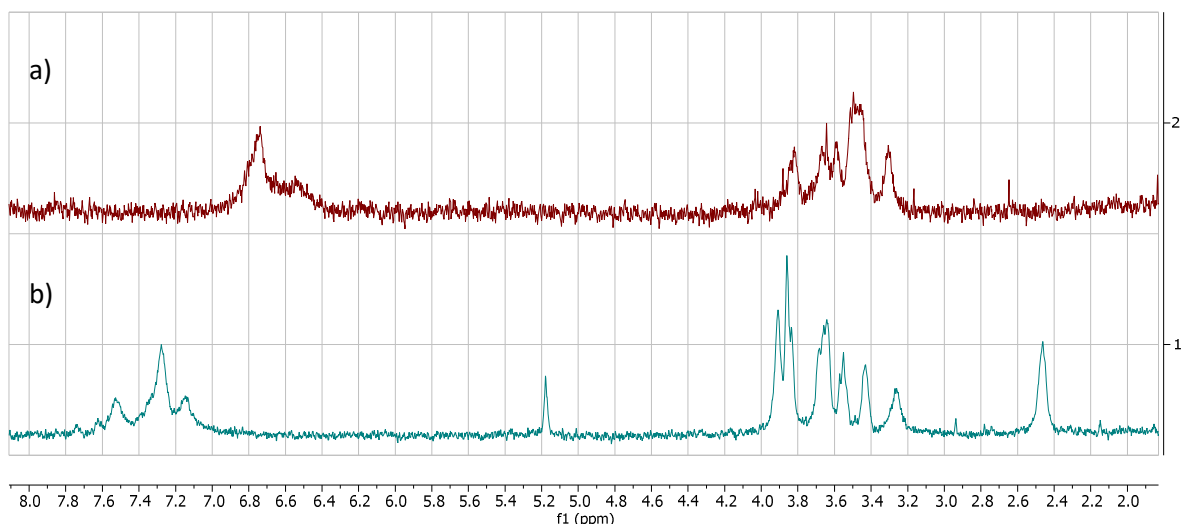


Figura 3.6 Espectros de ^1H -RMN de los derivados a) bis(benzimidazol)- β -D-Man (**3**) y b) bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man (**7**) en D_2O (pH = 7, 25°C) a la concentración de $500\ \mu\text{M}$

En los experimentos 2D-DOSY realizados (Figura 3.7), se puede apreciar de nuevo la diferencia existente entre ambas familias de derivados. El coeficiente de difusión obtenido para los derivados de β -D-Manosa es de $10^{-10}\ \text{m}^2/\text{s}$ para el derivado de β -D-Man de la primera generación (**3**) y de $1.77 \cdot 10^{-10}\ \text{m}^2/\text{s}$ para el derivado de β -D-Man de la segunda (**7**), un aumento de casi el doble, lo que indica que el grado de agregación es menor para estos derivados con espaciador de β -Alanina.

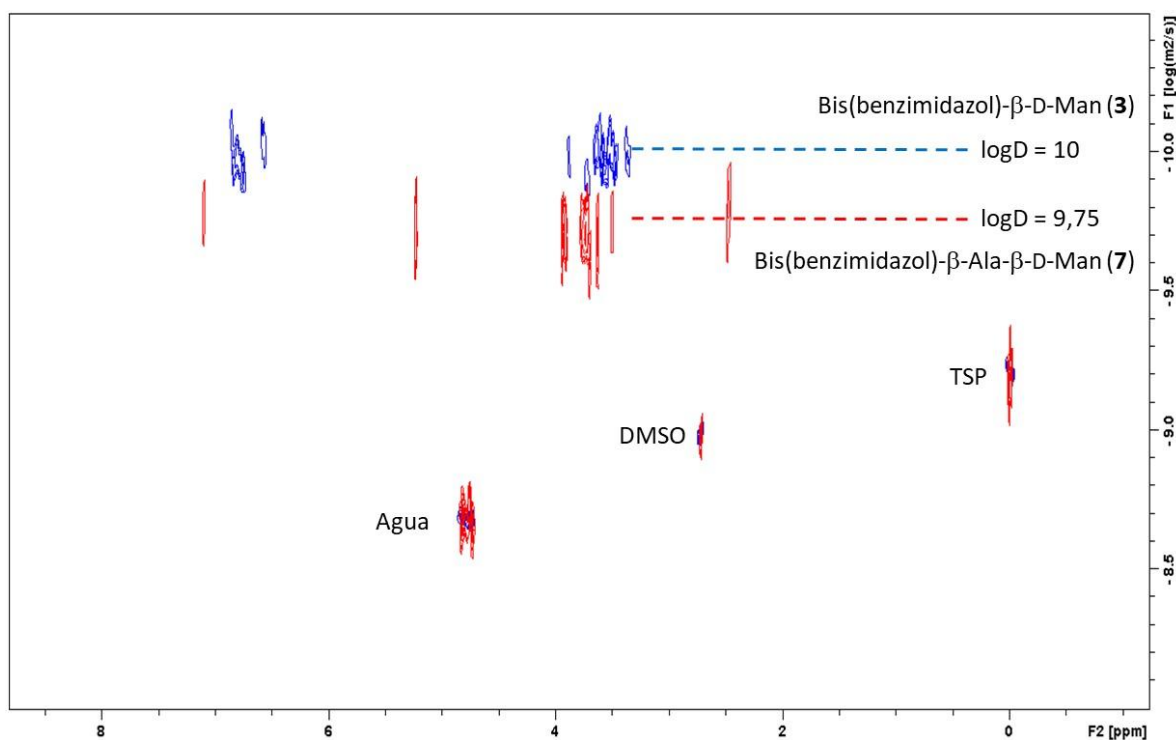


Figura 3.7 Espectros de 2D-DOSY de los derivados bis(benzimidazol)- β -D-Man (**3**, en azul) y bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man (**7**, en rojo) en D_2O (pH = 7, 25°C) a la concentración de $500\ \mu\text{M}$

Así, mediante las técnicas empleadas (CD y RMN) se ha podido comprobar que los derivados de bis(benzimidazol)- β -Ala presentan diferencias en su modo de agregación respecto de los que contienen el carbohidrato directamente unido al bis(benzimidazol). La nueva familia de derivados (**5** - **9**) parece presentar un menor grado de agregación que la familia anterior, lo cual supone una ventaja adicional para el estudio de la interacción con el ADN. El estudio por calorimetría de esta nueva familia de derivados permitirá caracterizar el proceso de autoasociación en un futuro.

3.3. Comparación de la interacción por CD entre las dos familias de derivados con el oligonucleótido A₂T₂

Los estudios de interacción por CD de estos nuevos derivados (**5** - **9**) con oligonucleótidos de ADN se han realizado en las mismas condiciones que se optimizaron en el capítulo anterior para los ligandos (**1** - **4**) (tampón MOPS 25 mM, pH=7.05, [NaCl] 200 mM, a 20 °C y concentración de ligando constante de 8 μ M). Estos nuevos derivados tienen un espectro UV muy similar a los estudiados anteriormente, por lo que su banda de absorción a 340 nm tampoco va a solapar con la absorción del ADN.

Como puede apreciarse en la Figura 3.8, en la interacción del nuevo derivado de β -D-Glucosa (**6**) con el oligonucleótido A₂T₂ aparece una banda de CD inducida muy intensa y positiva, indicando que hay interacción en forma de monómero. Esta banda inducida es mucho más intensa que la inducida al interaccionar el derivado de β -D-Glucosa de la familia anterior (**2**) con el mismo oligonucleótido. El valor máximo de ICD en estos dos casos pasa de 19.9 mol⁻¹cm⁻¹ para el derivado **2** a 72.0 mol⁻¹cm⁻¹ para el derivado **6**, lo que quiere decir que su parte aromática es capaz de introducirse mucho más en el interior del surco menor.

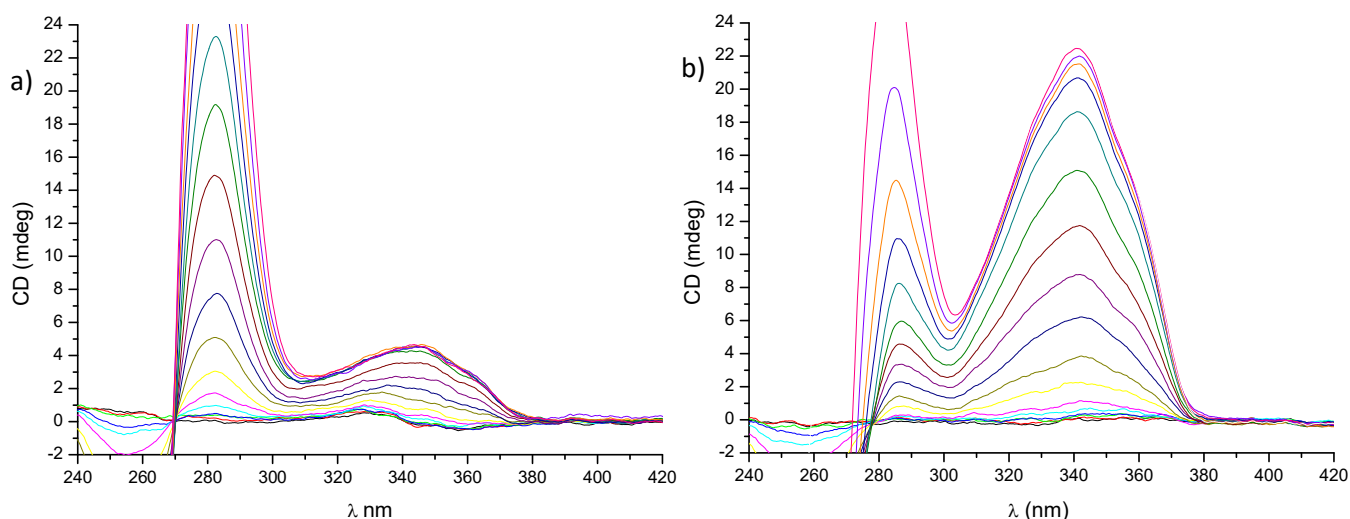


Figura 3.8 Experimentos de valoración por CD realizados con A₂T₂ con los derivados: a) bis(benzimidazol)-β-D-Glc (**2**) y b) bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Glc (**6**) a la misma concentración de ligando [L] = 8 μM

Este hecho es muy relevante, dado que nuestro interés es acercar el carbohidrato al interior del surco menor del ADN y, aunque el CD no da información sobre la localización de azúcar, es importante comprobar que el vector con espaciador de β-Alanina logra adentrarse ahora mucho más en el interior del surco.

3.4. Comparación de la interacción por STD entre las dos familias de derivados

Los experimentos de valoración por CD han mostrado evidencias de que la introducción de un espaciador de β-Alanina en el vector es capaz de acercar la parte aromática en el surco menor de oligonucleótidos de ADN, pero aún es necesario comprobar si el carbohidrato es capaz de llegar también hasta el interior del mismo. Para obtener esta información, se va emplear la resonancia magnética nuclear, llevando a cabo los mismos experimentos de STD optimizados en el capítulo anterior con los complejos formados con *ct*-DNA.

Tal como se comprobó anteriormente, los nuevos derivados parecen presentar un menor grado de agregación que los derivados de la familia anterior y esto se refleja también a la hora de evaluar los blancos de STD. En ellos, la saturación recibida por el ligando apenas supera el 10%, lo que supone una mejora en comparación con los derivados anteriores.

Los experimentos STD se han realizado con los derivados de β -D-Glucosa (**6**, Figura 3.9) y β -D-Manosa (**7**, Figura 3.10) y en ambos hay transferencia de saturación al carbohidrato, indicando que hay interacción con esta zona del ligando.

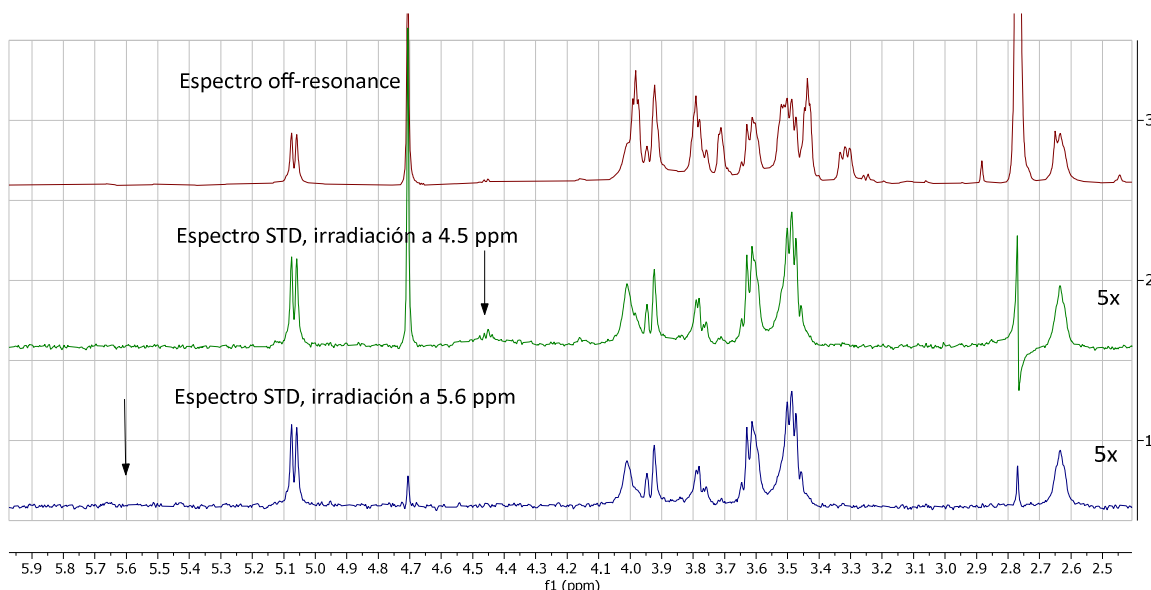


Figura 3.9 Ampliación de los espectros de STD en la zona de las resonancias del carbohidrato del complejo bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glucosa (**6**) / *ct*-DNA en D₂O, tampón imidazol a 37 °C

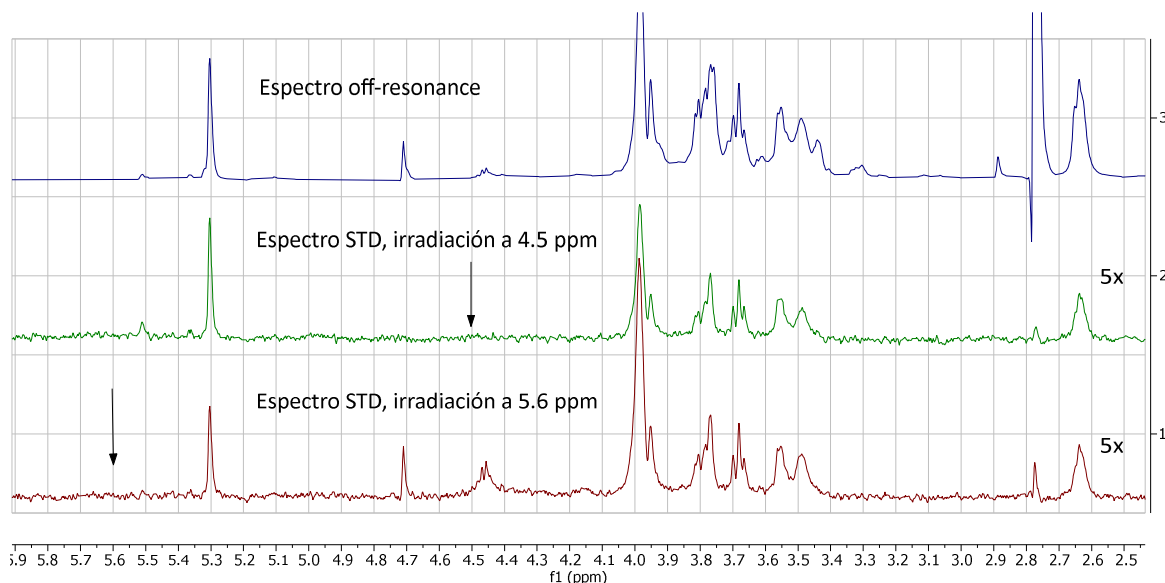


Figura 3.10 Ampliación de los espectros de STD en la zona de las resonancias del carbohidrato del complejo bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa (**7**) / *ct*-DNA en D₂O, tampón imidazol a 37 °C

El valor de STD real obtenido en estos experimentos se muestra en la Tabla 3.1. Este valor es muy superior al obtenido en los experimentos realizados con la primera generación de ligandos, llegando incluso a un 40% de transferencia de saturación, cuando los derivados anteriores apenas alcanzaban el 10%.

% STD bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glc (6) / <i>ct</i> -DNA								
	Irradiación	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H6'
Blanco	4,5ppm	6	5	5	5	4	8	4
	5,6ppm	7	2	2	2	2	2	1
13% <i>ct</i>-DNA	4,5ppm	41	33	37	38	38	20	14
	5,6ppm	47	33	30	17	12	26	32
Δ STD	4,5ppm	35	28	32	33	34	12	10
	5,6ppm	40	31	28	15	10	24	31

% STD bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man (7) / <i>ct</i> -DNA								
	Irradiación	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H6'
Blanco	4,5ppm	3	14	3	3	3	14	5
	5,6ppm	12	3	2	2	3	4	2
13% <i>ct</i>-DNA	4,5ppm	44	38	13	30	36	38	20
	5,6ppm	47	33	12	26	32	30	17
Δ STD	4,5ppm	41	24	10	27	33	24	15
	5,6ppm	35	30	10	24	29	26	15

Tabla 3.1 Porcentaje de STD obtenido para cada protón del carbohidrato de los complejos de bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glucosa (6) y bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa (7) con *ct*-DNA

La diferencia de STD entre ambas familias de derivados es muy notable, tal como se puede comprobar en la Figura 3.11. Estos resultados muestran que, efectivamente, en este caso el carbohidrato sí que se encuentra en el interior del surco menor. Esto corrobora que todo el ligando se encuentra en el interior del surco menor y por tanto va a ser posible evaluar el papel del carbohidrato en la interacción con el surco menor del ADN.

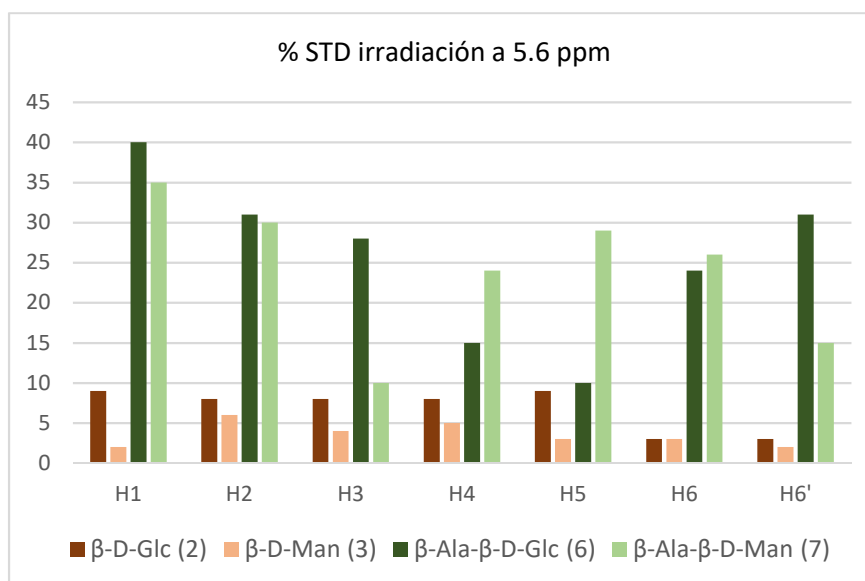


Figura 3.11 Comparativa del porcentaje de STD obtenido para cada protón del carbohidrato de los complejos de los derivados **2**, **3**, **6** y **7** con *ct*-DNA

3.5. Cuantificación de la interacción de los derivados de bis(benzimidazol)- β -Ala con oligonucleótidos de ADN

Uno de los objetivos más relevantes de esta tesis consiste en cuantificar el aporte a la interacción de los diferentes carbohidratos con el surco menor del ADN y conocer su papel en estos procesos de reconocimiento molecular. Una vez se ha podido comprobar experimentalmente que el carbohidrato está en contacto con el interior del surco menor en esta nueva generación de ligandos (**5** - **9**), podemos analizar y estudiar las diferencias en la interacción de cada uno de ellos.

Como hemos mencionado en el capítulo anterior, para poder conocer la contribución del carbohidrato a la interacción, es necesario disponer de un modelo con una forma y volumen similar a la de un carbohidrato, pero sin la presencia de grupos hidroxilo que puedan actuar como aceptores y dadores de enlace de hidrógeno. Para ello, se ha preparado un derivado que sustituye el carbohidrato por un ciclohexilo (**5**). De esta forma disponemos de un derivado cuya interacción con el ADN únicamente puede establecerse por la acción del propio vector.

Otro de los objetivos de esta tesis es determinar si la cooperatividad de enlace de hidrógeno afecta al proceso de interacción con el ADN. Este efecto podrá estudiarse comparando la interacción de los derivados de β -D-Glucosa (**6**) y β -D-Manosa (**7**).

Por otro lado, también es interesante el estudio del efecto de la quiralidad del carbohidrato en los procesos de interacción, por lo que se va a explorar en esta Tesis el comportamiento de los derivados de β -L-Glucosa (**8**) y β -L-Manosa (**9**) en su interacción con el ADN.

Además, se va a comparar la efectividad como ligandos del surco menor de nuestros ligandos con el Hoechst 33258 (Figura 3.12), tanto con el derivado de ciclohexilo como con los derivados glicosilados.

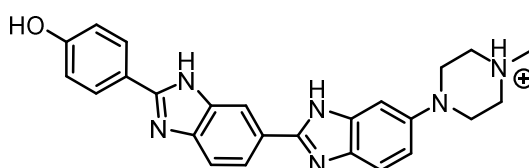


Figura 3.12 Estructura del Hoechst 33258

La metodología empleada para los estudios de interacción ha sido la realización de experimentos de valoración entre los ligandos y oligonucleótidos de ADN por dicroísmo circular con las secuencias mencionadas en el capítulo anterior: 5'-CGCGAATTCGCG-3' (que denominamos A_2T_2), 5'-CGCAAATTTGCG-3' (que denominamos A_3T_3) y 5'-GCGTACGCAGCG-3' (que denominamos R13).

3.5.1. Experimentos de interacción (valoraciones por CD)

La técnica empleada para estos estudios ha sido el dicroísmo circular. Tal como se detalló en el capítulo anterior, las valoraciones se han realizado a concentración constante de ligando, añadiendo cantidades crecientes de oligonucleótido. Todos los experimentos han sido realizados bajo las mismas condiciones (temperatura 20 °C, tampón MOPS 25 mM, pH = 7.05, [NaCl] 200 mM).

3.5.1.1. Valoraciones con los oligonucleótidos A_2T_2 y A_3T_3

En todos los experimentos de valoración realizados con los dodecámeros A_2T_2 y A_3T_3 , se observa la aparición de una banda de dicroísmo circular inducida por la formación del complejo en torno a 340 nm. Esta banda es positiva, e intensa lo que significa que, en el complejo formado, el ligando se sitúa en el surco menor de la doble hélice de ADN.⁶³ No se aprecian diferencias sustanciales en la banda de dicroísmo circular inducida ni entre

ligandos ni entre secuencias de oligonucleótido, por lo que podemos afirmar que todos los derivados se unen a ambas secuencias de ADN de una forma muy similar (Figura 3.13), haciendo posible su estudio comparativo. Los resultados empleando el oligonucleótido A₃T₃ se muestran en el Anexo.

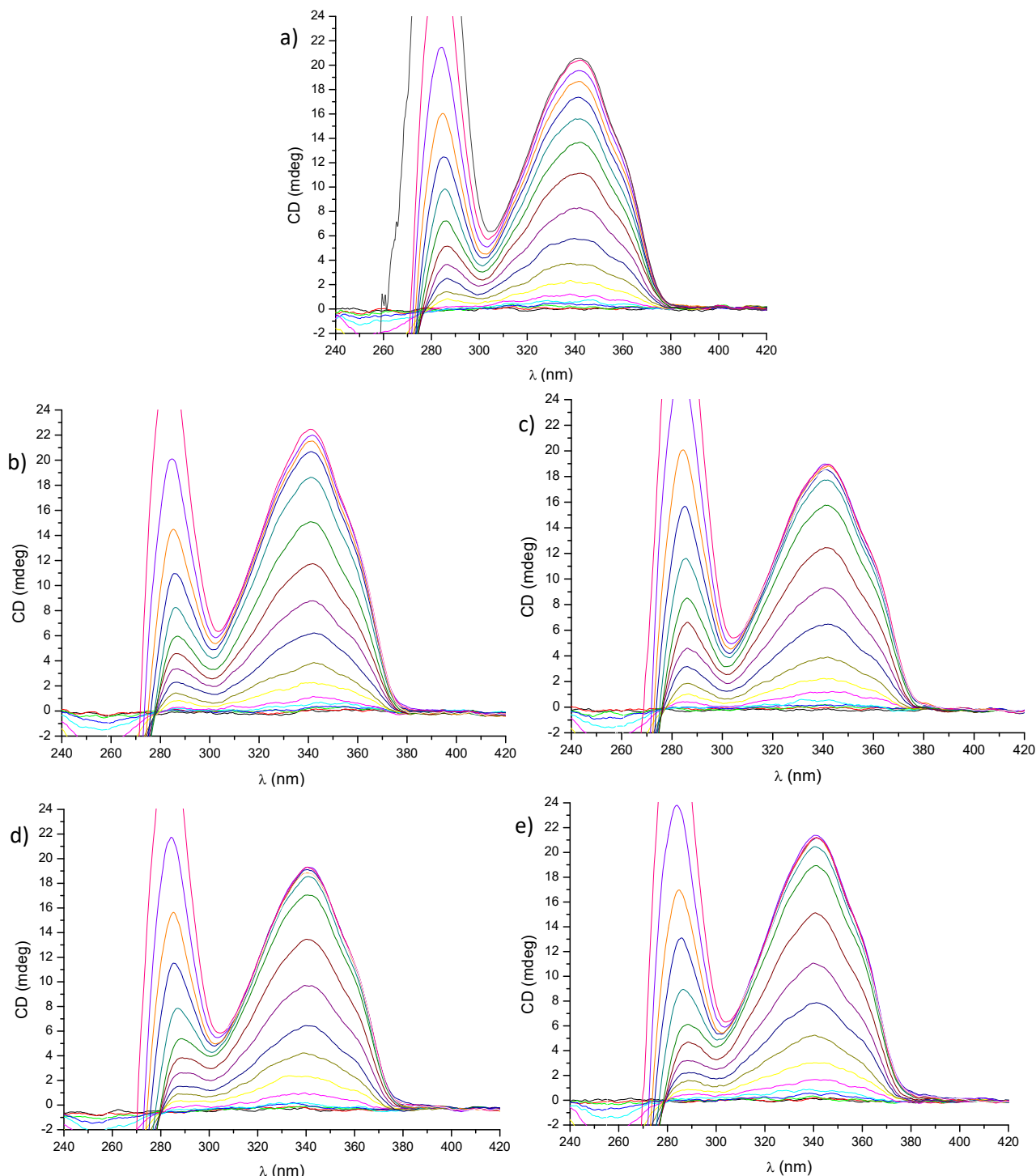


Figura 3.13 Espectros de dicroísmo circular de las valoraciones realizadas con A₂T₂ añadiendo cantidades crecientes de oligonucleótido a concentración constante de cada ligando: a) bis(benzimidazol)- β -Ala-Cy (**5**), b) bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glc (**6**), c) bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man (**7**), d) bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Glc (**8**), e) bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Man (**9**)

Como hemos mencionado en el apartado 3.3, el valor máximo de dicroísmo circular inducido es muy elevado en todos los casos, indicando la proximidad de los ligandos a las bases del ADN. Estos valores están comprendidos entre 70 - 80 mol⁻¹cm⁻¹ para todos los derivados glicosilados y en torno a 100 mol⁻¹cm⁻¹ para el derivado de ciclohexilo, indicando que este derivado se introduce ligeramente más en el interior del surco, mientras que todos los derivados glicosilados se introducen de forma similar entre sí.

3.5.1.2. Valoraciones con el oligonucleótido R13

El comportamiento observado en la interacción con la secuencia R13 es el mismo que para los derivados de la familia anterior. Se observa la aparición de una banda de doble signo y no simétrica en la zona de absorción del ligando (Figura 3.14). Este fenómeno tiene lugar cuando hay una superposición parcial de los cromóforos del ligando,⁶³ por lo que podemos afirmar que el complejo está formado por más de una molécula de ligando.

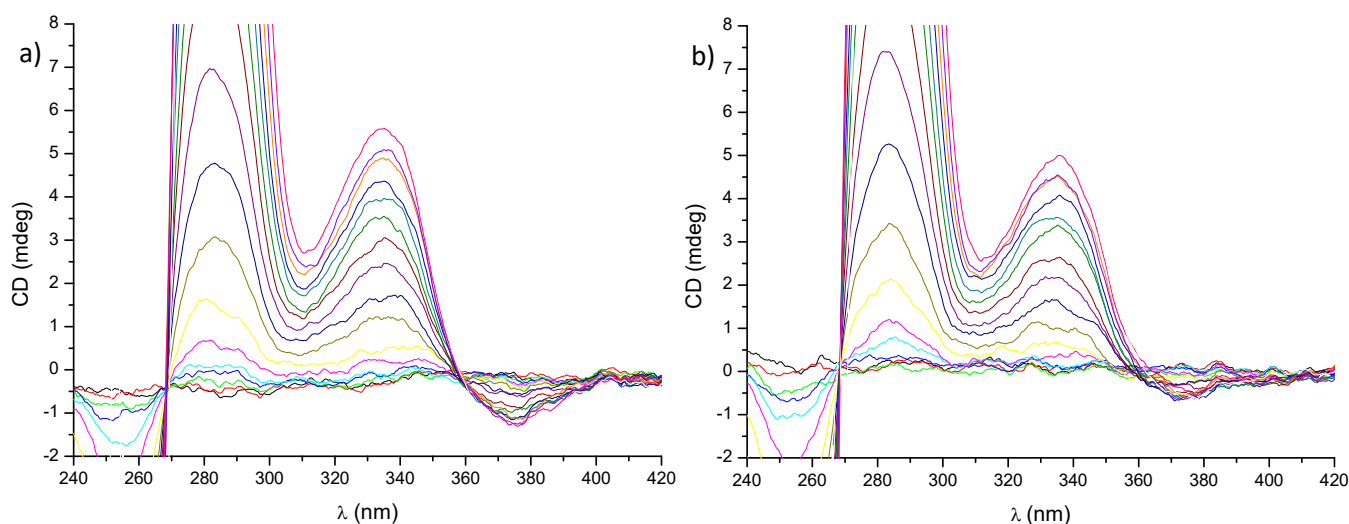


Figura 3.14 Espectros de dicroísmo circular de las valoraciones realizadas con R13 con los ligandos a) bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Glc (**6**) y b) bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Man (**7**)

Tal como se indicó en el capítulo anterior, el Hoechst 33258 se une a esta secuencia con una estequiometría de 4:1.⁵⁸ Para determinar la estequiometría de estos complejos será necesario realizar experimentos adicionales.

3.5.1.3. Estequiometría de los complejos: Job Plots

Tal como hemos mostrado en el capítulo anterior, el método de variación continua o método de Job (más comúnmente denominado *Job Plot* en inglés), es muy útil para

determinar la estequiometría de unión entre una macromolécula y su ligando. Por lo observado en los experimentos de valoración, se espera que los complejos formados por los oligonucleótidos A_2T_2 y A_3T_3 tengan estequiometría 1:1 con todos los ligandos, mientras que para la secuencia R13 se espera una estequiometría distinta.

Para la representación de los *Job Plots*, se ha seguido el máximo de la señal de dicroísmo circular inducido por la formación del complejo. En la Figura 3.15 se muestra a modo de ejemplo el experimento llevado a cabo con los ligandos derivados de β -D-Glucosa (**6**) y β -L-Glucosa (**8**) con el oligonucleótido A_2T_2 . Como se puede observar, el máximo en estos gráficos coincide con una fracción molar de ligando de 0.5, lo que se corresponde efectivamente con una estequiometría 1:1 ligando / oligonucleótido.

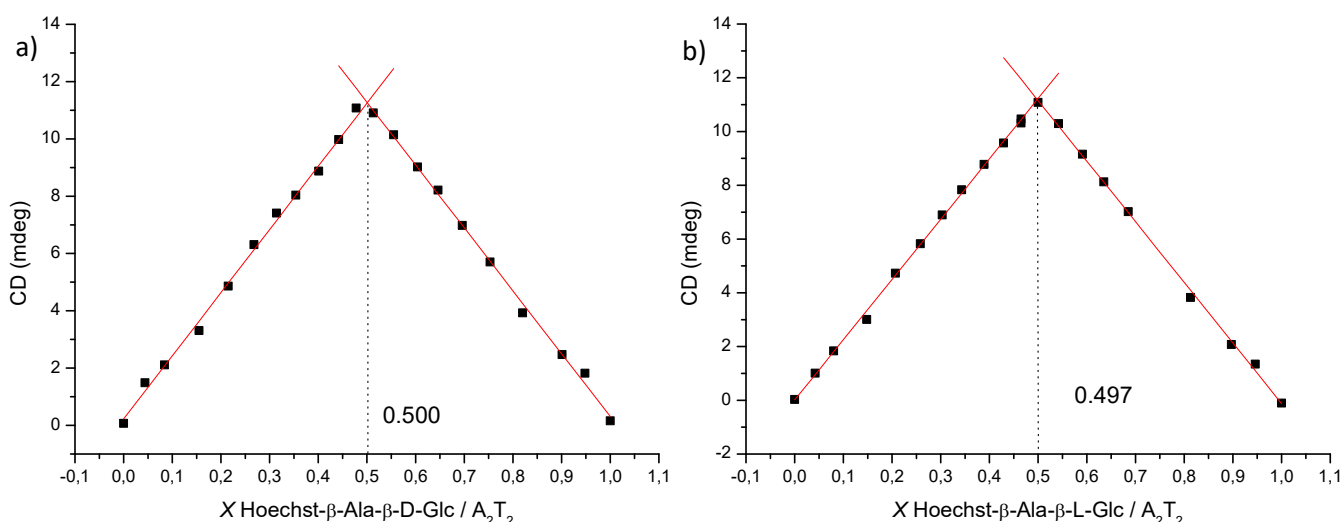


Figura 3.15 *Job Plots* obtenidos para los complejos de los derivados de a) β -D-Glucosa (**6**) y b) β -L-Glucosa (**8**) con el oligonucleótido A_2T_2

Por otro lado, para la interacción con el oligonucleótido R13, lo esperado es que haya más de una molécula de ligando en el complejo. Los *Job Plots* mostrados en la Figura 3.16 muestran su máximo en una fracción molar próxima a 0.667, indicando así que el complejo está formado por 2 moléculas de ligando y una de oligonucleótido.

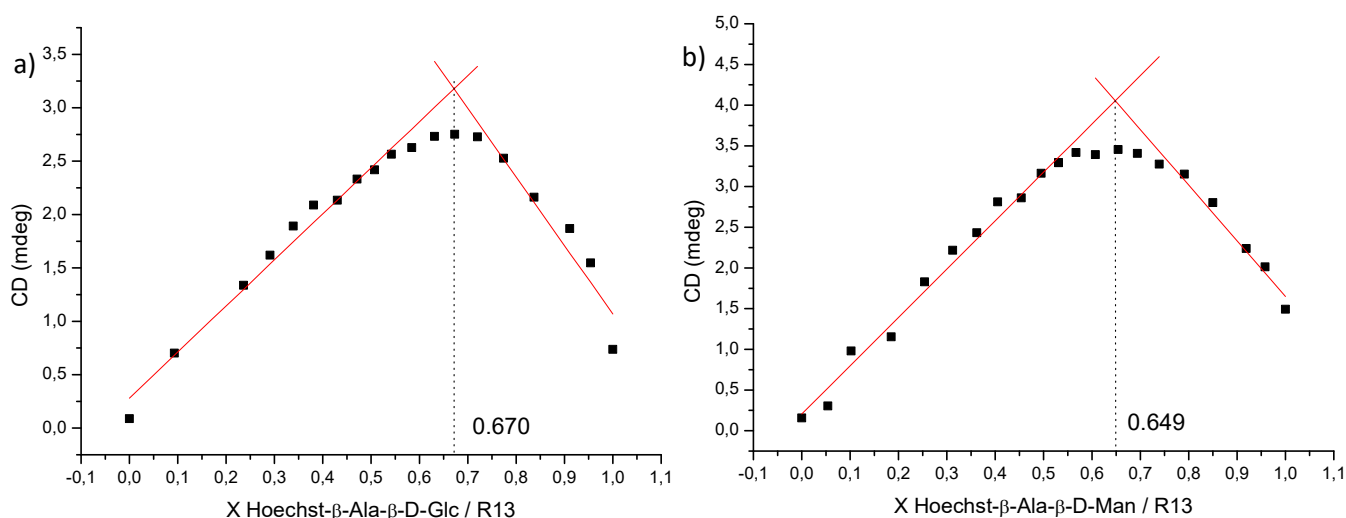


Figura 3.16 Job Plots obtenidos para los complejos de los derivados de a) β -D-Glucosa (**6**) y b) β -D-Manosa (**7**) con el oligonucleótido R13 siguiendo la banda a 330 nm

A la vista de estos experimentos podemos concluir que los ligandos estudiados se unen de forma distinta al ADN dependiendo de la secuencia con la que se les hace interaccionar. En el Hoechst 33258 también ha sido observado y estudiado en profundidad este comportamiento en la literatura, formando complejos de estequiometría 1:1, 2:1 o incluso 4:1 según la secuencia a la que se una.⁶⁸

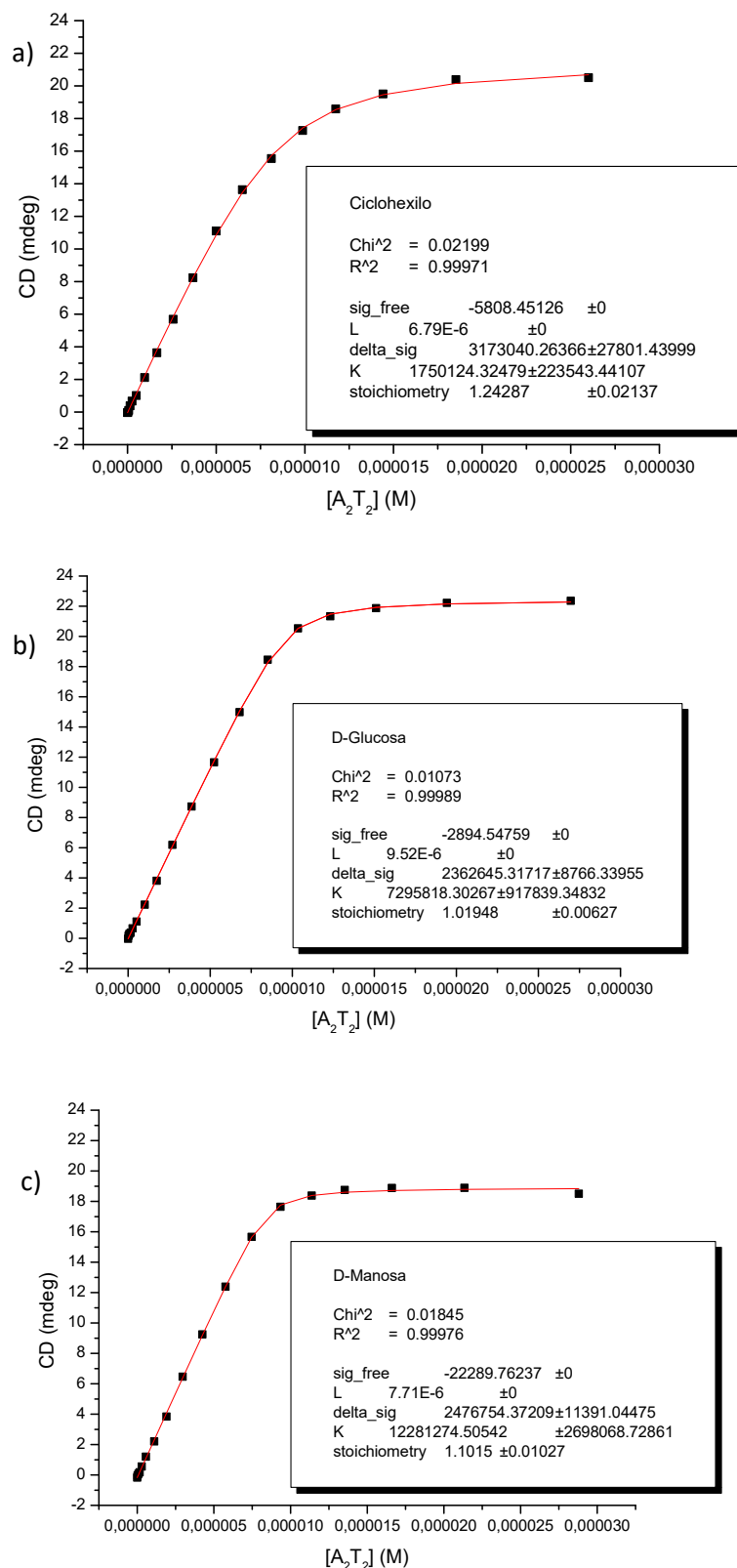
3.5.2. Cálculo de las constantes de asociación (K_a) y energía libre de Gibbs (ΔG) para los complejos con A_2T_2 y A_3T_3

La utilidad de los experimentos de valoración va más allá de conocer el modo de unión de los ligandos al ADN, a partir de ellos es posible obtener las isotermas de unión de los distintos ligandos a cada secuencia de ADN. Estos datos pueden ajustarse a la Ecuación 3.1 para obtener la constante de afinidad (K en la ecuación) de los ligandos para cada secuencia así como la estequiometría de unión (N en la ecuación).

$$I_{obs} = I_{free}[L] + \Delta I_{bound} \left[\frac{\left(1 + K[L]_T + K \frac{[ADN]_T}{N}\right) - \sqrt{\left(1 + K[L]_T + K \frac{[ADN]_T}{N}\right)^2 - 4K^2[L]_T \frac{[ADN]_T}{N}}}{2K} \right]$$

Ecuación 3.1 Ecuación empleada para el ajuste de los datos de las isotermas de unión

En todos los casos tenemos un muy buen ajuste a esta ecuación (Figura 3.17), obteniendo además de este ajuste un valor para la estequiometría de 1, que coincide con lo observado en los experimentos previos de *Job Plot*.



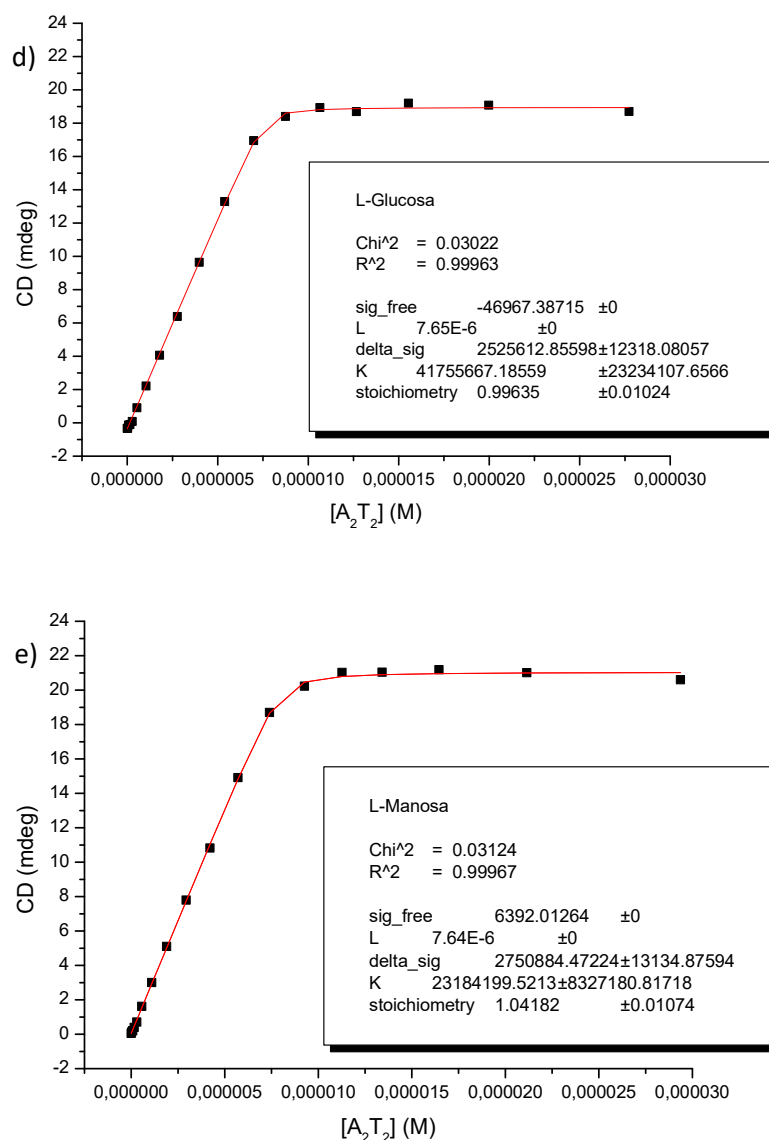


Figura 3.17 Ajuste de las isotermas de unión para las valoraciones con A₂T₂ y los ligandos derivados de: a) Ciclohexilo (**5**), b) β-D-Glucosa (**6**), c) β-D-Manosa (**7**), d) β-L-Glucosa (**8**) y e) β-L-Manosa (**9**)

A partir de estos ajustes se obtienen las constantes de asociación (K_a) de los diferentes complejos. Como se puede observar en la Tabla 3.2, el derivado de ciclohexilo (**5**) presenta la constante de asociación más baja para ambas secuencias, lo que indica que efectivamente, existe un claro aporte del carbohidrato a la interacción y que los enlaces de hidrógeno que puede establecer el carbohidrato deben jugar un papel importante.

Ka (M ⁻¹)	Cy (5)	D-Glc (6)	D-Man (7)	L-Glc (8)	L-Man (9)	Hoechst
A ₂ T ₂	1.75·10 ⁶	7.30·10 ⁶	12.3·10 ⁶	41.8·10 ⁶	23.2·10 ⁶	13.0·10 ⁶
A ₃ T ₃	0.95·10 ⁶	16.1·10 ⁶	7.22·10 ⁶	34.8·10 ⁶	20.5·10 ⁶	10.4·10 ⁶

Tabla 3.2 Constantes de asociación calculadas para cada complejo en M⁻¹ obtenidas de los experimentos de valoración

Además, en esta familia de ligandos (5 - 9), existen diferencias significativas entre los distintos derivados glicosilados, es decir, cada carbohidrato contribuye de forma distinta a la interacción. Para poder cuantificar apropiadamente la contribución de cada derivado a la interacción, se ha evaluado el incremento de la energía libre de Gibbs (Tabla 3.3) a través de la ecuación $\Delta G = -RT \ln K$ (a la temperatura de 20°C).

ΔG (Kcal/mol)	Cy (5)	D-Glc (6)	D-Man (7)	L-Glc (8)	L-Man (9)	Hoechst
A ₂ T ₂	- 8.4	- 9.2	- 9.5	- 10.2	- 9.9	- 9.5
A ₃ T ₃	- 8.0	- 9.7	- 9.2	- 10.1	- 9.8	- 9.4

Tabla 3.3 Energía libre de Gibbs a 20°C para la formación de cada complejo

La estabilidad de los complejos es ligeramente mayor con el oligómero A₂T₂ (excepto para el derivado de β -D-Glucosa 6), tal y como ocurre con el Hoechst 33258. A continuación, se detallarán los resultados obtenidos para la energía libre de Gibbs con detenimiento.

3.5.2.1. Comparación de la estabilidad de los complejos formados con respecto al Hoechst 33258 en su interacción con A₂T₂ y A₃T₃

Para comprobar la eficacia de los distintos derivados como ligandos del surco menor del ADN se va a comparar la estabilidad del complejo que forman con respecto al complejo formado con el Hoechst 33258, en cuya estructura está basada su diseño. Para ello, se ha calculado la diferencia entre ΔG calculada para cada ligando y ΔG calculada para el Hoechst: $\Delta\Delta G = \Delta G \text{ Ligando} - \Delta G \text{ Hoechst}$. Los resultados se muestran en la Tabla 3.4.

$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Cy (5)	D-Glc (6)	D-Man (7)	L-Glc (8)	L-Man (9)
A₂T₂	1.1	0.3	0.0	- 0.7	- 0.4
A₃T₃	1.4	- 0.3	0.2	- 0.7	- 0.4

Tabla 3.4 Diferencia en la estabilidad del complejo formado con cada ligando respecto del Hoechst 33258

Para ambas secuencias, el derivado de ciclohexilo forma un complejo menos estable que Hoechst 33258, con una diferencia de más de 1 Kcal/mol. Además, los derivados con carbohidratos de la serie L forman complejos más estables que el Hoechst con diferencias de -0.4 Kcal/mol para el derivado de β -L-Manosa (9) y -0.7 Kcal/mol para el derivado de β -L-Glucosa (8) (las Ka son el doble de grandes en el caso de L-Manosa y el triple en el caso de L-Glucosa).

Por tanto, a consecuencia del aporte de los carbohidratos de la serie L, se ha logrado obtener unos ligandos cuya afinidad por el ADN es más fuerte que la del compuesto de referencia en el que está basada su estructura, el Hoechst 33258.

3.5.2.2. Contribución del carbohidrato a la estabilidad de los complejos con A₂T₂ y A₃T₃

Para cuantificar la contribución del carbohidrato a la interacción, se ha usado como referencia el valor la energía libre de Gibbs del complejo formado por el derivado que contiene el ciclohexilo (5) para cada secuencia de ADN. Así, se han obtenido las diferencias en el incremento de la energía libre de Gibbs ($\Delta\Delta G$, Tabla 3.5) para cada derivado glicosilado: $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{carbohidrato}} - \Delta G_{\text{ciclohexilo}}$.

$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	D-Glc (6)	D-Man (7)	L-Glc (8)	L-Man (9)
A₂T₂	- 0.8	- 1.1	- 1.8	- 1.5
A₃T₃	- 1.7	- 1.2	- 2.1	- 1.8

Tabla 3.5 Contribución del carbohidrato a la interacción

Por primera vez en el grupo de investigación, se ha podido cuantificar la contribución del carbohidrato a la interacción. Como queda reflejado en la Tabla 3.5, todos los carbohidratos estabilizan el complejo respecto al ciclohexilo y además lo hacen de manera muy efectiva. Esta contribución oscila entre -0.8 y -1.8 Kcal/mol para A₂T₂ y

entre -1.2 y -2.1 Kcal/mol para A_3T_3 , unas cantidades considerablemente elevadas, siendo el mejor carbohidrato la β -L-Glucosa (-1.8 y -2.1 Kcal/mol para A_2T_2 y A_3T_3 respectivamente).

Para explicar estas diferencias entre ciclohexilo y carbohidrato, hay que tener en cuenta sus diferencias en cuanto a interacciones se refiere: difieren tanto en las interacciones CH - π , como en la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno.^{15,16} En este caso concreto, no es de esperar que las interacciones CH - π tengan influencia, pues los ligandos no pueden acceder a la cara aromática de las bases del ADN. Los enlaces de hidrógeno pueden tener lugar tanto con los fosfatos de la doble hélice, como con los centros dadores y aceptores del interior del surco menor. Tal como se vio en los experimentos de STD, el carbohidrato se encuentra en el interior del surco menor, por lo que podemos afirmar que las diferencias observadas en la afinidad se deben exclusivamente a los enlaces de hidrógeno formados entre el carbohidrato y las bases del ADN en el surco menor.

3.5.2.3. Influencia de la quiralidad del carbohidrato en su contribución a la estabilidad de los complejos con A_2T_2 y A_3T_3

La diferencia que existe entre la serie D y la serie L de carbohidratos es que son series enantioméricas, es decir, todos sus centros quirales están invertidos. El ADN es una macromolécula quiral, y por tanto es de esperar que parejas enantioméricas de ligandos presenten diferente afinidad por él, formando complejos diastereoméricos. Para cuantificar su contribución, se han calculado las diferencias en el incremento de la energía libre de Gibbs entre derivados con carbohidratos de las series D y L: $\Delta\Delta G = \Delta G \text{ Serie L} - \Delta G \text{ Serie D}$.

$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Glucosa	Manosa
A_2T_2	- 1.0	- 0.4
A_3T_3	- 0.4	- 0.6

Tabla 3.6 Contribución de la diferente quiralidad a la interacción (en todos los casos se ha obtenido como la diferencia entre ΔG serie L – ΔG serie D)

La serie L de carbohidratos se encuentra presente en muy pocos casos en la naturaleza y, sorprendentemente, en todos los casos forma el complejo más estable

(Tabla 3.6). Esta contribución extra alcanza el valor de -1.0 Kcal/mol en el caso de la Glucosa para el dodecámero de Dickerson (A_2T_2).

La única diferencia entre ambas series de ligandos es que todos sus centros quirales se encuentran invertidos, lo que se traduce en que los grupos hidroxilo de los carbohidratos adoptan una distinta posición espacial relativa (Figura 3.18). Esta distinta disposición puede hacer que alguno de estos hidroxilos pueda formar algún enlace de hidrógeno adicional con los centros dadores o aceptores de las bases, debido a una ubicación espacial más favorable.

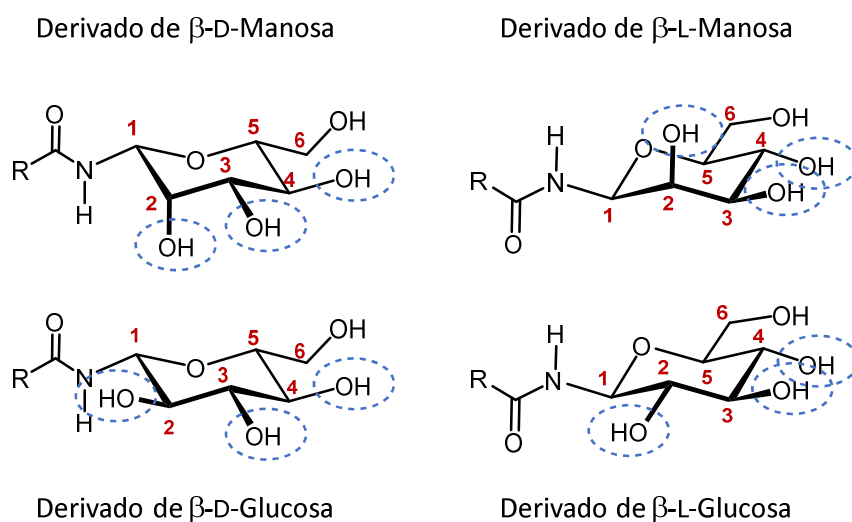


Figura 3.18 Distinta posición espacial relativa que adoptan los grupos hidroxilo en los ligandos estudiados

Para que esta diferencia en la posición de los grupos hidroxilo de lugar a una diferente afinidad por el ADN, los carbohidratos deben estar orientados dentro del surco menor de forma que los hidroxilos en posiciones 2 y 3 se encuentren próximos a las bases del ADN. Dadas las diferencias observadas entre los ligandos (Tabla 3.6), es muy probable que la interacción se produzca de esta manera, sin embargo para poder afirmarlo será necesario un estudio estructural más exhaustivo.

3.5.2.4. Evaluación de la posible contribución de la cooperatividad de enlace de hidrógeno en β -D-Manosa con A_2T_2

El grupo de investigación ha estado particularmente interesado en encontrar evidencias experimentales sobre la cooperatividad de enlace de hidrógeno en disolución

acuosa y su posible contribución a la interacción entre carbohidratos y ADN. En estudios previos del grupo, se han hallado pruebas de que en derivados de β -Manosa existe en disolución acuosa un enlace de hidrógeno intramolecular, cuando tiene un grupo amida en posición anomérica.⁵¹ En nuestro caso, para calcular esta posible contribución, se ha tomado como referencia el complejo formado con el derivado de β -D-Glucosa, ya que este carbohidrato no puede formar dicho enlace de hidrógeno intramolecular (Figura 3.19).

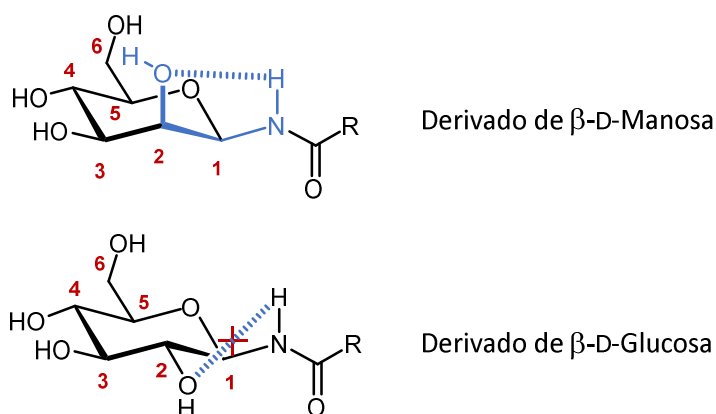


Figura 3.19 Enlace de Hidrógeno intramolecular presente en derivados de Manosa

Así, en los estudios llevados a cabo en esta tesis, se ha observado que en los complejos con el dodecámero A_2T_2 , hay una contribución extra a la interacción de -0.3 Kcal/mol por parte del derivado de β -D-Manosa (**7**) sobre el de β -D-Glucosa (**6**). Como se observa en la Figura 3.19, la Glucosa y la Manosa tan sólo se diferencian en la orientación del hidroxilo en posición 2, que pasa de posición ecuatorial (Glucosa) a axial (Manosa), por lo que esta diferencia en la estabilidad de los complejos es considerablemente elevada.

Se trata de un resultado prometedor, aunque con la información de la que disponemos hasta este punto, no podemos afirmar con rotundidad que dicho aporte sea debido a la contribución de la cooperatividad de enlace de hidrógeno. Para poder confirmar la existencia de dicha cooperatividad será necesario realizar estudios estructurales detallados de este complejo.

3.6. Conclusiones

Se ha introducido una modificación en el vector presentado en el capítulo anterior con el objetivo de dar libertad de movimiento al carbohidrato en los ligandos y que pueda establecer su interacción con el surco menor del ADN. Se ha elegido como espaciador entre el bis(benzimidazol) y el carbohidrato la β -Alanina.

Además, esta modificación ha permitido, según muestran los experimentos de CD y RMN en estado libre, reducir el grado de agregación que sufrían estos derivados, facilitando su posterior estudio de interacción con el ADN (experimentos de STD y valoraciones por CD).

Los experimentos de interacción han mostrado, tanto por CD como por RMN, que estos nuevos ligandos (**5** - **9**) logran introducirse mucho más en el interior del surco menor. Esto hace posible que el carbohidrato establezca su interacción con las bases del ADN y, por tanto, sea factible un estudio comparativo en profundidad de la interacción de los distintos derivados glicosilados.

Se ha realizado un estudio comparativo de la interacción de diferentes derivados glicosilados con varios oligonucleótidos de ADN mediante valoraciones seguidas por dicroísmo circular. Gracias a estos experimentos, se ha podido conocer el modo de unión de dichos ligandos. Con los dodecámeros A_2T_2 y A_3T_3 se forman complejos 1:1, mientras que en el complejo con R13 se encuentran dos moléculas de ligando (complejos 1:2). Los datos obtenidos en estas valoraciones han podido ajustarse perfectamente a una ecuación de unión al ADN.

Los derivados con carbohidratos de la serie L han superado en afinidad al compuesto de referencia, el Hoechst 33258, en el que está basada su estructura con las secuencias A_2T_2 y A_3T_3 .

Por primera vez en el grupo de investigación, se ha logrado calcular la contribución del carbohidrato a la interacción con el surco menor del ADN. Además, este aporte ha resultado ser bastante elevado, llegando a alcanzar -2.1 Kcal/mol en el caso del derivado de β -L-Glucosa (**8**) con A_3T_3 .

Se ha evaluado también la influencia de la quiralidad del carbohidrato en el proceso de interacción y se ha encontrado que, en todos los casos, los complejos formados con derivados de azúcares de la serie L (**8** y **9**) son más estables que los formados con derivados de la serie D (**6** y **7**).

En cuanto a la contribución de la cooperatividad de enlace de hidrógeno a la interacción, se ha encontrado un caso interesante donde es posible que este fenómeno tenga lugar. Para su comprobación será necesario realizar un estudio estructural del complejo.

Capítulo 4

ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON OLIGONUCLEÓTIDOS DE ADN POR RMN

4.1. Introducción

El siguiente paso en el estudio de la interacción carbohidrato-ADN es determinar la estructura del complejo que forman los ligandos con un oligonucleótido, para así obtener información a escala atómica de cómo se produce dicha interacción. Una vez se logre determinar la posición del carbohidrato, será posible ir alternando las bases del ADN con las que interacciona. De esta forma, teniendo en cuenta los centros dadores y aceptores tanto del carbohidrato como de las bases del ADN, sería posible establecer un código de reconocimiento, es decir, conocer qué carbohidratos interaccionan de forma más eficiente con qué combinación de pares de bases del ADN.

El oligonucleótido seleccionado para este estudio estructural es el dodecámero de Dickerson, al que hemos denominado A₂T₂. Este oligonucleótido ha sido ampliamente estudiado en la literatura y ha sido asignado por RMN, tanto en su forma libre⁷³ como formando complejos con varios ligandos como el Hoechst 33258.⁵⁵ En cuanto a su empleo para el estudio estructural por RMN presenta varias ventajas:

- Es capaz de formar un giro completo y estable de la doble hélice de B-ADN sin tener un exceso en número de residuos que dificulte la asignación.
- Al tener una secuencia autocomplementaria, se reducen a la mitad el número de señales presentes en el espectro (en su forma libre).
- La asignación secuencial de las resonancias de sus protones ha sido descrita en la literatura.⁷³
- Conocemos el modo de unión de nuestros ligandos a esta secuencia. Se forman complejos de estequiometría 1:1, más sencillos de caracterizar. Además, los ligandos poseen una afinidad elevada por esta secuencia, lo que garantiza la presencia total de complejo en disolución.

Como es bien conocido, la estructura del ADN, está formado por desoxirribosas, bases nitrogenadas y grupos fosfato. Las bases nitrogenadas son compuestos heterocíclicos aromáticos y se clasifican como bases púricas (Adenina y Guanina) y pirimidínicas (Citosina y Timina) (Figura 4.1). En la posición 9 de las bases púricas y en la posición 1 de las bases pirimidínicas se une la 2'-desoxi-D-ribosa a través de un enlace

β -glicosídico en su carbono 1', formando los distintos nucleósidos. Estos nucleósidos se unen unos a otros mediante grupos fosfato a través de los carbonos 3' y 5' para formar la estructura del ADN.

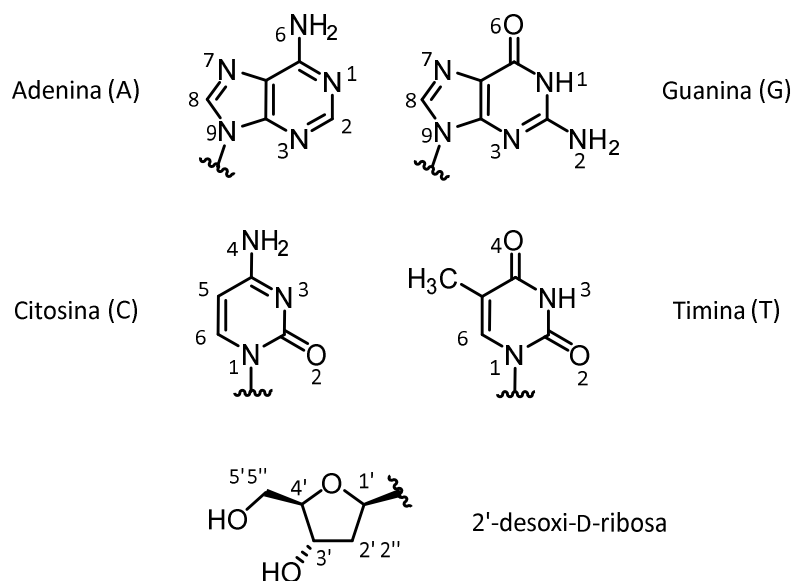


Figura 4.1 Estructura de las bases nitrogenadas y la 2'-desoxi-D-ribosa con su numeración

Las resonancias de estos protones aparecen a desplazamientos químicos característicos, como se puede ver en la Figura 4.2. Este espectro se ha realizado en D_2O a 25°C, tampón imidazol- d_4 25 mM, NaCl 100 mM, empleando TSP como referencia, a una concentración de oligonucleótido de 1 mM. Estas condiciones experimentales se emplearán también para formación y la caracterización de los complejos.

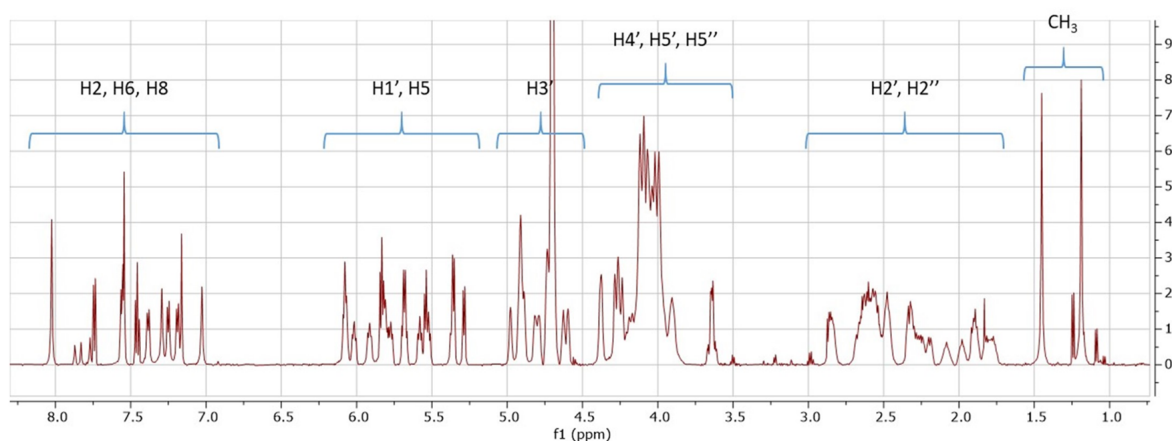


Figura 4.2 Espectro de 1H -RMN del oligonucleótido A_2T_2 en D_2O y los desplazamientos químicos en los que aparecen los distintos tipos de protones

Puesto que la asignación de las resonancias de este oligonucleótido no está descrita en estas condiciones específicas (disolución reguladora de imidazol- d_4), es necesario realizar su caracterización para, posteriormente, poder comparar estos resultados con los de los complejos. Para ello, el experimento TOCSY (*total correlation spectroscopy*) nos proporciona información acerca de la conectividad a través de enlaces y en él se pueden localizar fácilmente los protones H5 y H6 de las citosinas, pues son los únicos protones aromáticos que se acoplan entre sí. Del mismo modo, es sencillo localizar los protones H6 y CH₃ de las timinas, pues también se acoplan entre sí (Figura 4.3).

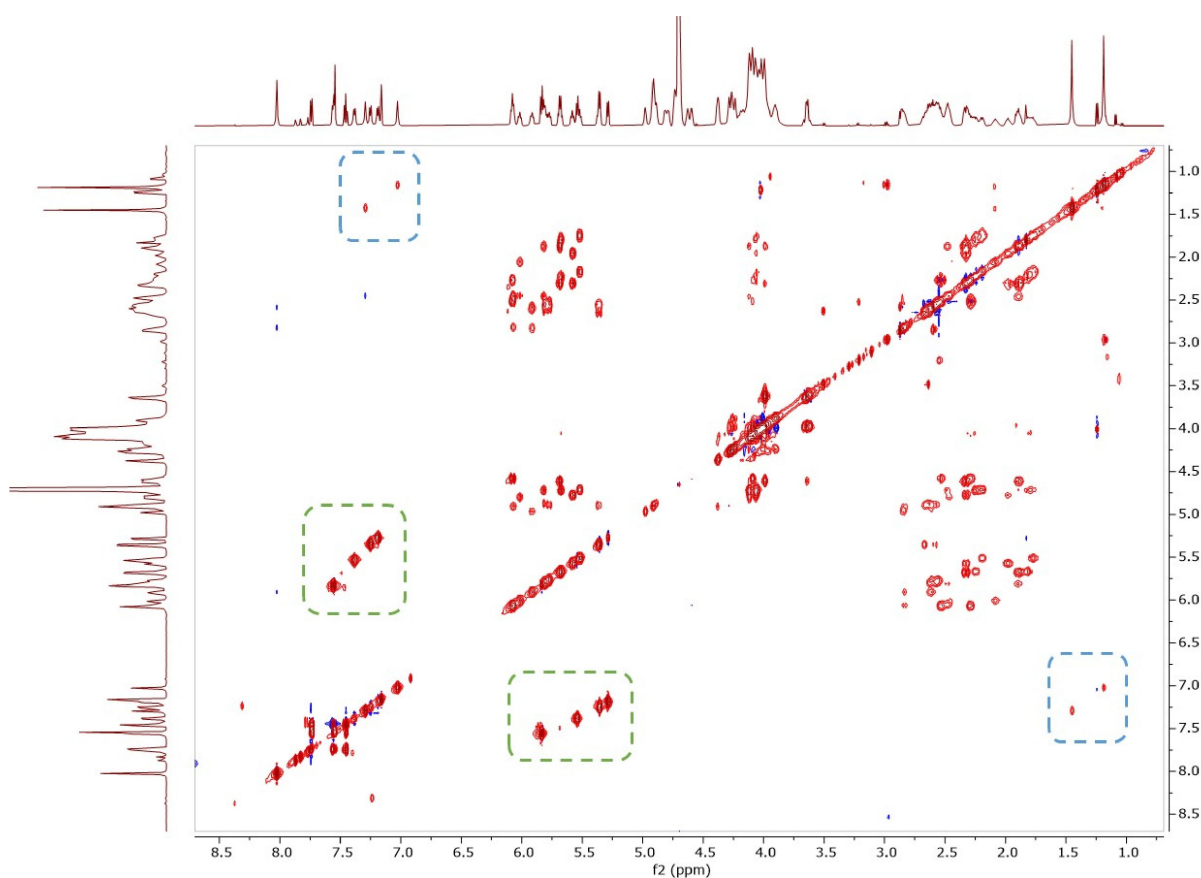


Figura 4.3 Espectro TOCSY del oligonucleótido A₂T₂ (tiempo de mezcla 70 ms) en D₂O. En azul se muestran los picos de cruce entre H6 y CH₃ de las timinas. En verde los picos de cruce entre H5 y H6 de las citosinas

Por otro lado, el experimento NOESY (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*) proporciona información acerca de la proximidad espacial que existe entre dos protones (Figura 4.4). Así, una vez localizadas las dos timinas y cuatro citosinas es posible, gracias a este experimento, determinar la continuidad de cada una de las hebras del oligonucleótido a través de los protones de las bases nitrogenadas y los protones anoméricos de las desoxirribosas.

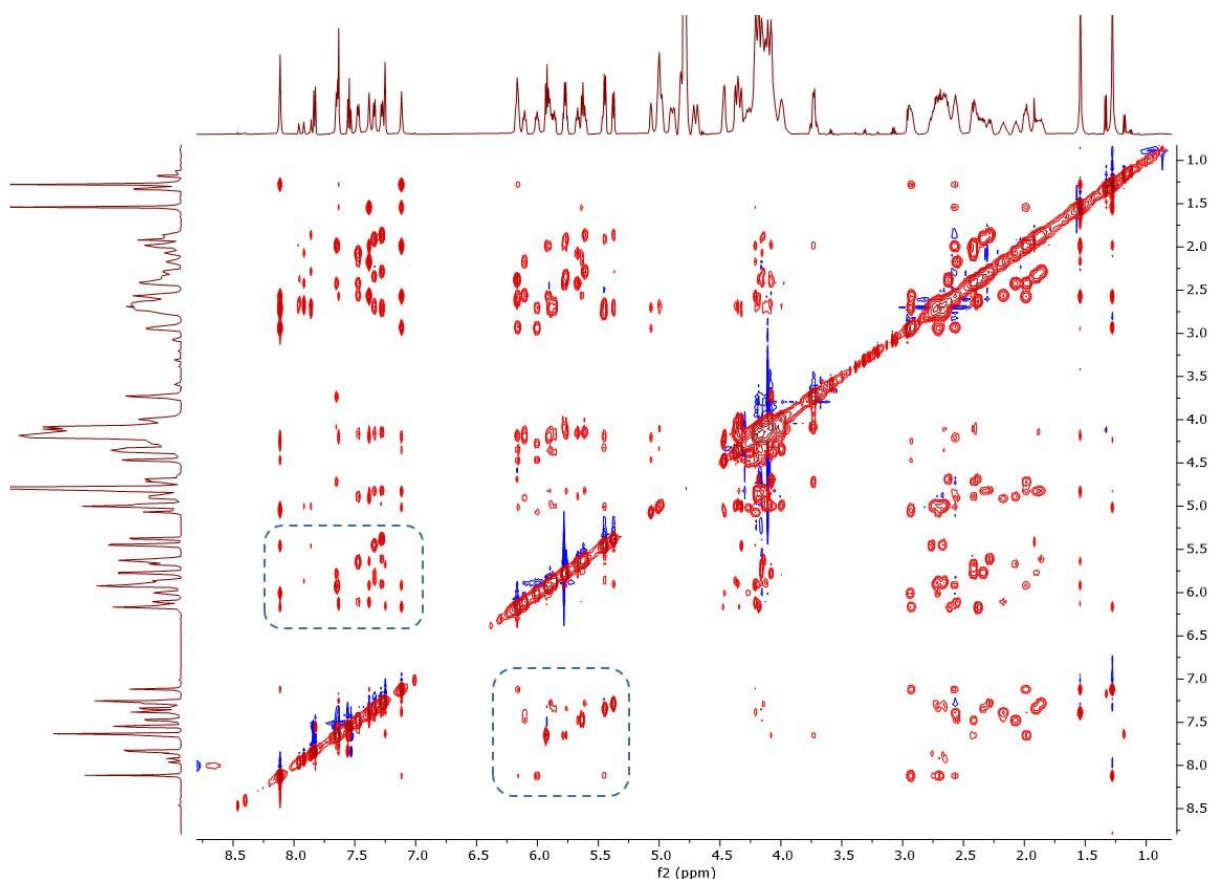


Figura 4.4 Espectro NOESY del oligonucleótido A_2T_2 (tiempo de mezcla 200 ms) en D_2O . En azul la región que muestra la conectividad entre las bases nitrogenadas (H6 y H8) y las desoxirribosas (H1')

Según la metodología descrita en la literatura,⁷³ los protones H8 de las purinas (A, G) y H6 de las pirimidinas (C, T) están siempre próximos al protón H1' anomérico de su desoxirribosa y al anomérico de la desoxirribosa que se encuentre a continuación (en sentido $5' \rightarrow 3'$, ver Figura 4.5). De esta forma es posible identificar cada uno de los residuos en una misma hebra de ADN. Existen además otros nOes adicionales que ayudan a confirmar la estructura como los que existen entre los protones aromáticos H6 y H8 con los protones H2'' de las desoxirribosas.

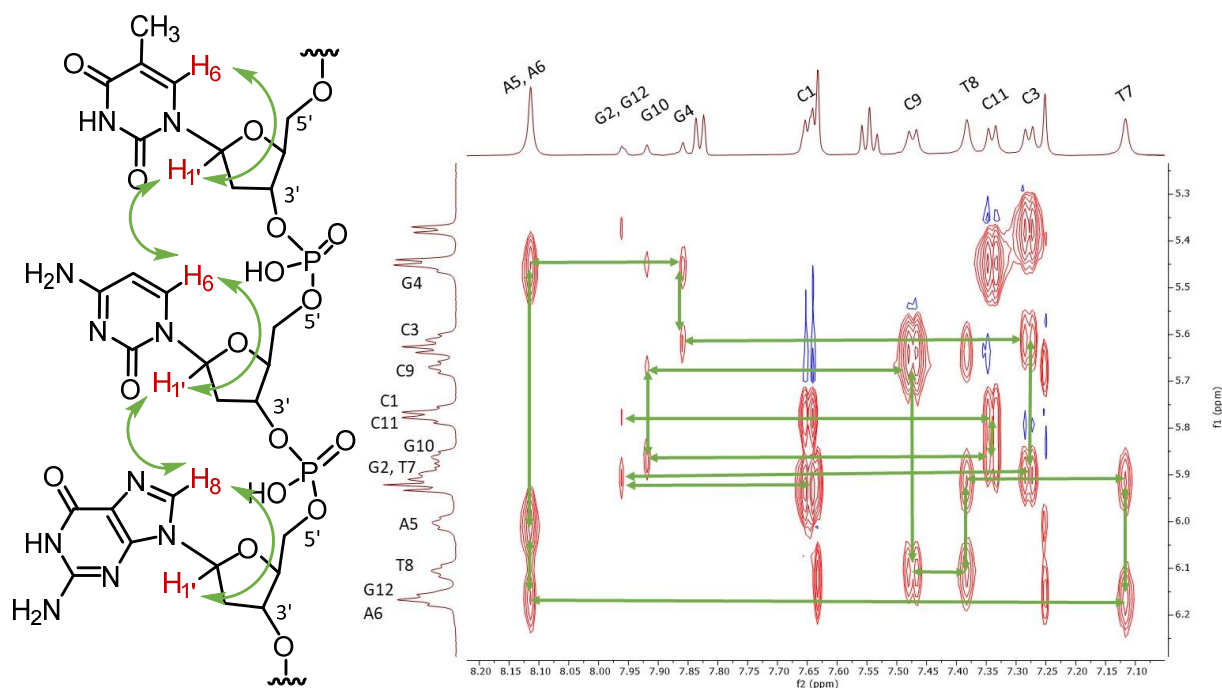


Figura 4.5 Continuidad de los nOes observados en una hebra de ADN y su seguimiento para el oligonucleótido A₂T₂

Una vez establecida la secuencia del oligonucleótido, es posible asignar el resto de protones de las desoxirribosas a través del experimento TOCSY. La asignación del oligonucleótido A₂T₂ (cuya secuencia es 5'-C¹G²C³G⁴A⁵A⁶T⁷T⁸C⁹G¹⁰C¹¹G¹²-3') en nuestras condiciones experimentales se muestra en la Tabla 4.1.

	H8	H6	H5	H2	CH ₃	H1'	H2''	H2'	H3'	H4'
C1	-	7,65	5,93	-	-	5,78	2,12	1,99	4,72	4,08
G2	7,96	-	-	-	-	5,90	2,66	2,57	4,98	4,35
C3	-	7,28	5,38	-	-	5,61	2,28	1,86	4,82	4,13
G4	7,86	-	-	-	-	5,47	2,77	2,68	5,00	4,32
A5	8,11	-	-	7,25	-	6,00	2,95	2,70	5,07	4,46
A6	8,11	-	-	7,63	-	6,17	2,93	2,60	5,01	4,46
T7	-	7,12	-	-	1,28	5,91	2,57	1,96	4,82	4,21
T8	-	7,38	-	-	1,54	6,11	2,57	2,17	4,91	4,21
C9	-	7,47	5,63	-	-	5,67	2,42	2,07	4,88	4,16
G10	7,92	-	-	-	-	5,86	2,72	2,57	5,00	4,18
C11	-	7,34	5,45	-	-	5,73	2,34	1,91	4,82	4,16
G12	7,96	-	-	-	-	6,17	2,63	2,37	4,69	4,18

Tabla 4.1 Desplazamiento químico en ppm de cada protón del oligonucleótido A₂T₂ en D₂O, 25°C, tampón imidazol-*d*₄, empleando TSP como referencia

4.2. Asignación del complejo formado por bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Man (9) con A₂T₂

Una vez caracterizado y asignado el oligonucleótido libre, podemos realizar del mismo modo la asignación de los complejos. Con ello se pretende conseguir información estructural del complejo y conocer cómo es la interacción a escala atómica entre el carbohidrato y las bases del ADN. Es decir, determinar cuál es concretamente el sitio de interacción del carbohidrato y qué centros del mismo intervienen en ella.

Para ello, se va a estudiar el complejo formado entre el derivado bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Manosa (9) y el oligonucleótido A₂T₂. Se ha elegido este ligando por presentar una de las mayores constantes de afinidad por este oligonucleótido ($23.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) y, además, tener la capacidad de formar un enlace de hidrógeno cooperativo a través del hidroxilo 2 de la Manosa, cuya detección en estas condiciones sería muy interesante.

Al formarse el complejo 1:1 con el ligando, la simetría del oligonucleótido se rompe. Esto es debido a que las dos hebras que lo forman dejan de ser idénticas al interaccionar de forma distinta cada una de ellas con el ligando, dando lugar a un desdoblamiento de todas las señales del oligonucleótido (Figura 4.6).

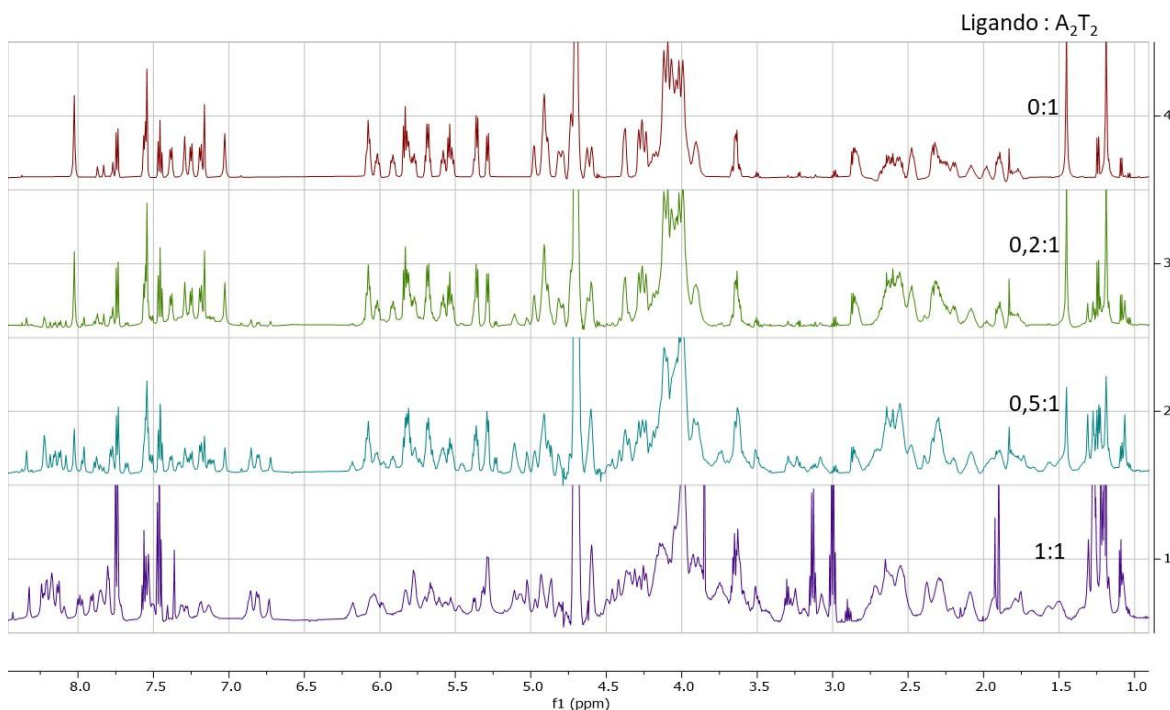


Figura 4.6 Espectros de ¹H-RMN de adiciones sucesivas del derivado de β -L-Manosa (9) al oligonucleótido A₂T₂ hasta la formación del complejo 1:1

Es importante que todo el nucleótido se encuentre formando el complejo y no haya señales correspondientes al oligonucleótido libre en el espectro que dificulten su asignación. Por ello, es necesario hacer un seguimiento de algunas de sus resonancias y comprobar cómo todas las señales de oligonucleótido libre han desaparecido. En la Figura 4.7 puede observarse cómo las resonancias correspondientes al oligonucleótido libre desaparecen completamente.

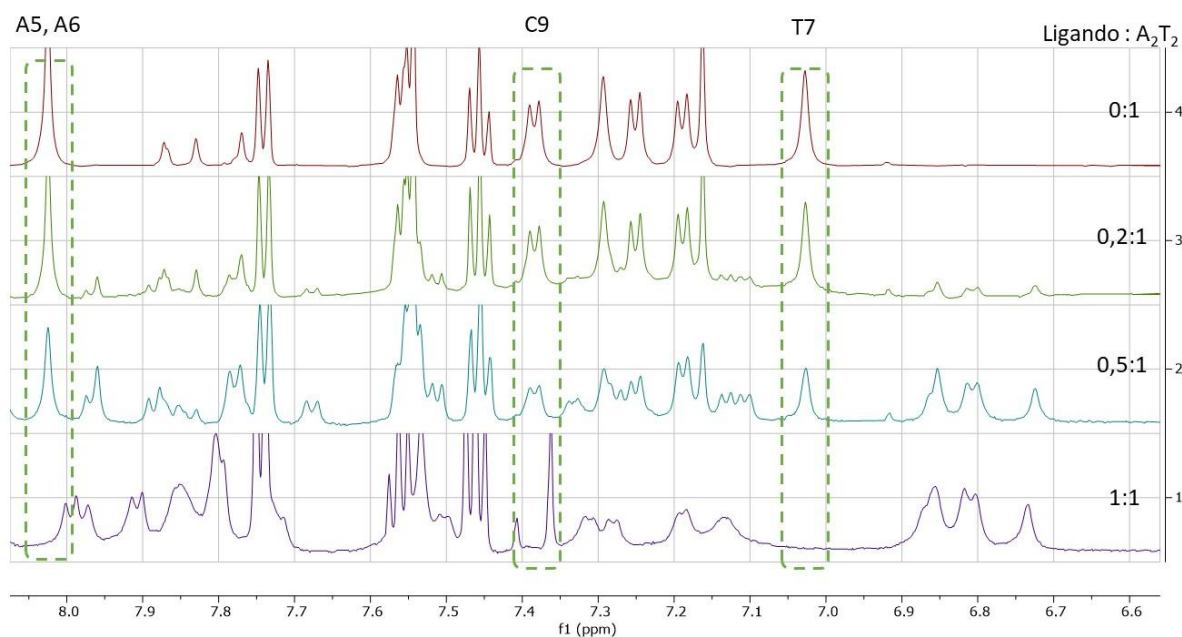


Figura 4.7 Ampliación de la zona aromática de los espectros de ^1H -RMN de adiciones sucesivas del derivado de β -D-Manosa (**9**) al oligonucleótido A_2T_2

Una vez formado el complejo, es posible asignar todas sus señales empleando la misma metodología que se ha utilizado para la asignación del oligonucleótido libre. La única diferencia es que, en este caso, es necesario distinguir entre ambas hebras de la doble hélice de ADN, a las que llamaremos hebra A y hebra B con el fin de distinguirlas. En el experimento TOCSY (Figura 4.8) podemos encontrar rápidamente las resonancias correspondientes a las cuatro timinas y las ocho citosinas.

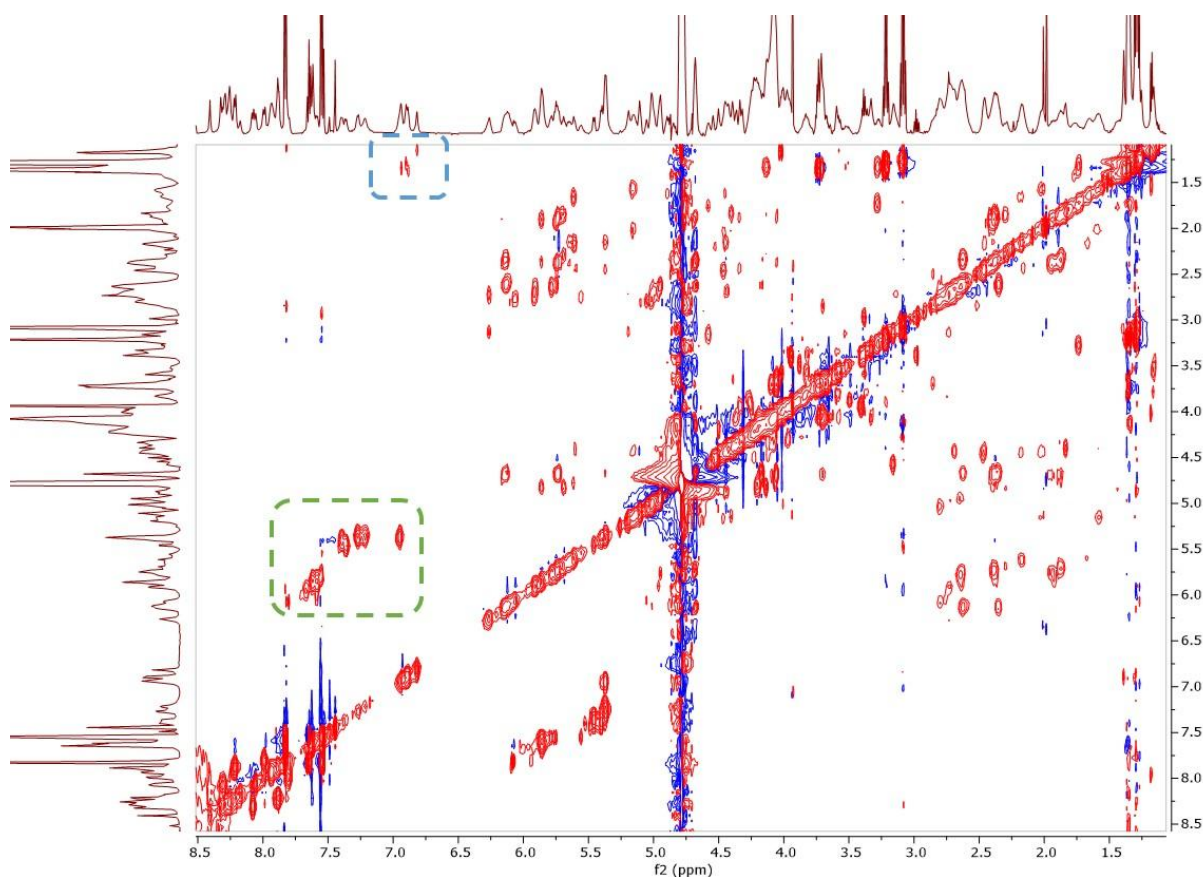


Figura 4.8 Espectro TOCSY del complejo formado por el ligando **9** y A₂T₂ (tiempo de mezcla 70 ms) en D₂O. En azul se muestran los picos de cruce entre H6 y CH₃ de las timinas. En verde los picos de cruce entre H5 y H6 de las citosinas

El siguiente paso es emplear el experimento NOESY (Figura 4.9) para seguir la continuidad de cada una de las hebras del oligonucleótido e ir asignando cada uno de los nucleósidos. Se emplea el mismo procedimiento utilizado para el caso del oligonucleótido libre, siguiendo los picos de cruce correspondientes entre las resonancias de los protones H6 y H8 de las bases con los protones anoméricos de las desoxirribosas.

Al haber el doble de señales en el espectro, esta tarea es más difícil, ya que es muy frecuente el solapamiento entre señales. Debido a ello, no ha sido posible la asignación completa de las hebras de ADN de este complejo, aunque la información obtenida sí ha posibilitado un análisis estructural del complejo. En concreto, ha sido posible la asignación de las bases desde A5 hasta C11 de cada una de las dos hebras A y B, suficiente para encontrar el sitio de unión del vector a este oligonucleótido (la asignación se muestra en el Anexo).

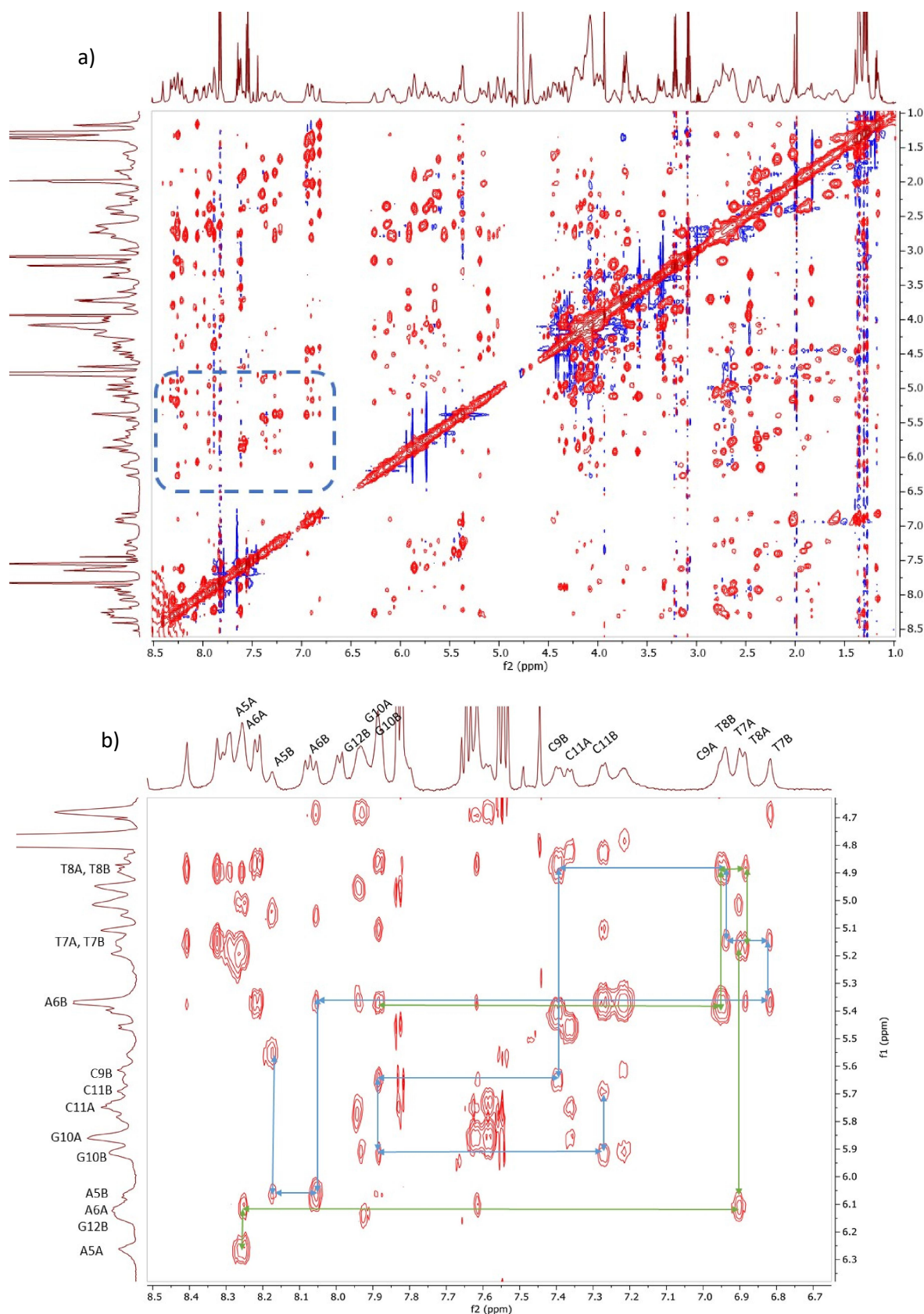


Figura 4.9 a) Espectro NOESY del complejo formado entre el ligando **9** y A₂T₂ (tiempo de mezcla 200 ms) en D₂O. b) Conectividad entre las resonancias de los protones H6 y H8 de las bases nitrogenadas y los protones anómicos de las desoxirribosas. Cada color representa la conectividad de cada hebra (en verde la hebra A y en azul la hebra B)

Para obtener información sobre la posición del vector dentro del complejo, se calcularon los desplazamientos químicos inducidos de los protones H6 y H8 de las bases nitrogenadas y del protón H1' de las desoxirribosas. Este desplazamiento químico se produce por la cercanía de la parte aromática del vector a dichos protones, haciendo que varíe el desplazamiento químico de sus resonancias respecto al oligonucleótido libre hasta 1.2 ppm.

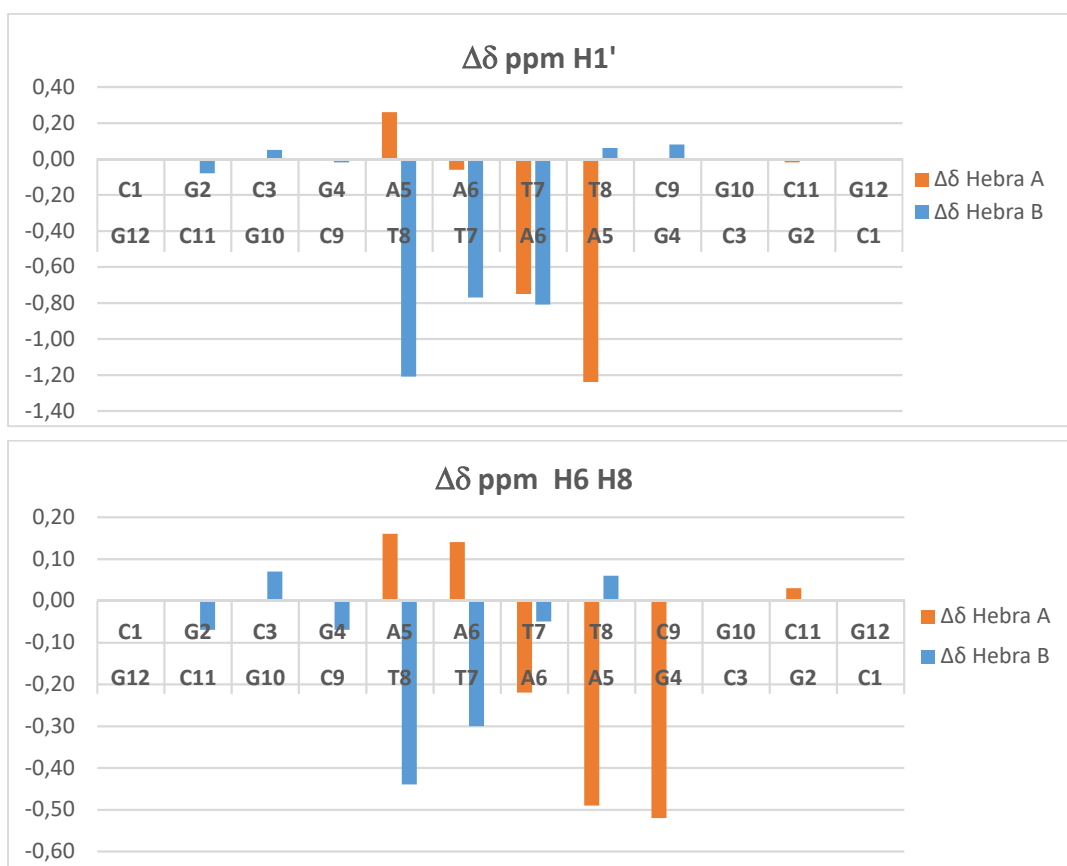


Figura 4.10 Desplazamiento químico inducido de los protones anoméricos de las desoxirribosas (H1') y de los aromáticos de las bases nitrogenadas (H6 y H8) para ambas hebras en el complejo bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Man (**9**) – A₂T₂

Como puede observarse en la Figura 4.10, la región que más sufre este desplazamiento químico inducido es la zona central del oligonucleótido correspondiente a las bases AATT, lo cual está dentro de lo esperado, pues es la secuencia de interacción para la cual está diseñado el vector. Este patrón de desplazamientos químicos inducidos es muy similar al descrito por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen para el complejo formado entre su ligando y el oligonucleótido tipo A₃T₃.⁶⁰

Se han encontrado además nOes entre la parte aromática del vector y la región AATT del oligonucleótido que confirman su posición dentro del complejo (Figura 4.11). Dichos nOes se producen con las bases A6, T7 y T8 del oligonucleótido, por lo que se puede afirmar que esta es la posición del vector dentro del complejo.

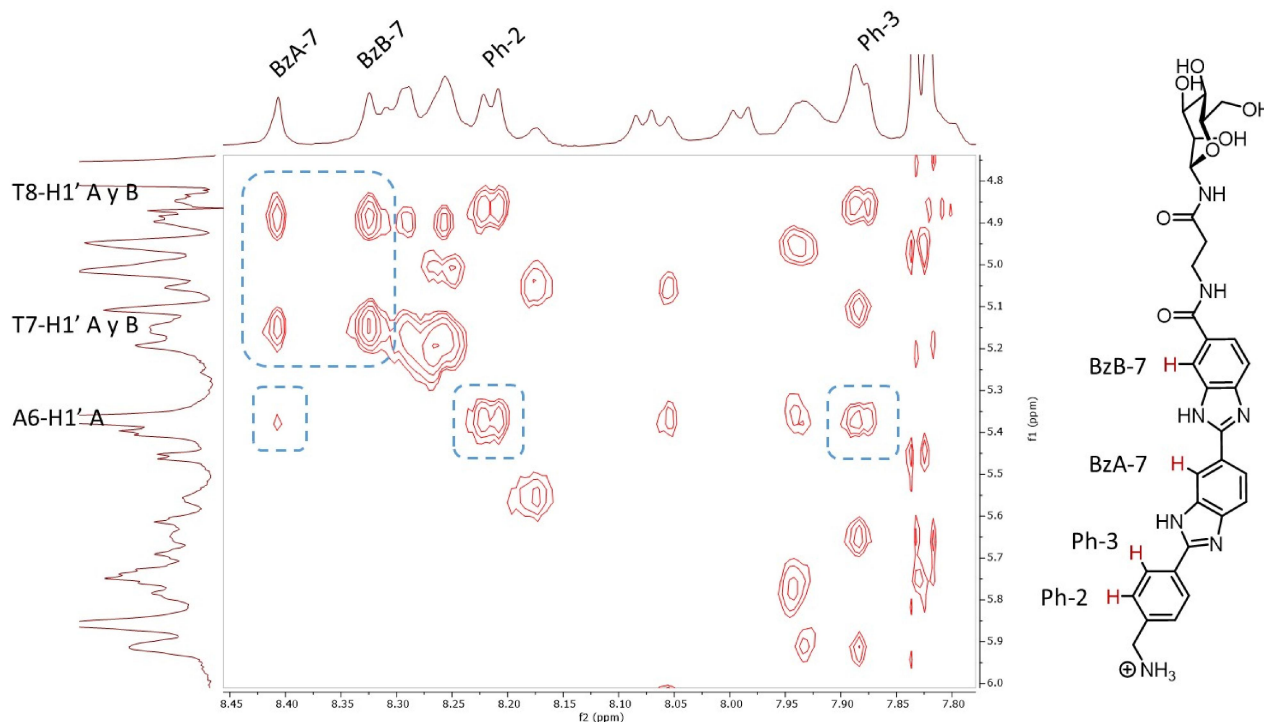


Figura 4.11 Picos de cruce encontrados en el experimento NOESY (tiempo de mezcla 200 ms) en D₂O entre el la parte aromática del ligando y las desoxirribosas del oligonucleótido

En la Figura 4.12 se muestran todos los nOes encontrados entre el ligando y el oligonucleótido en este complejo. Como puede comprobarse, el sitio de interacción del vector queda muy bien definido, ubicándose en la parte central AATT del oligonucleótido.

Sin embargo, no ha sido posible ubicar la posición exacta del carbohidrato, ya que sus resonancias solapan con la zona en la que se encuentran los protones H5' y H5'' del oligonucleótido (48 protones en total) y no ha sido posible su detección. Tampoco ha sido posible determinar la posición del espaciador de β -Alanina, en este caso por solapamiento con las resonancias de los protones H2' y H2'' de las desoxirribosas. Por tanto, dado que el objetivo es conocer el sitio de interacción del carbohidrato y conocer qué centros están implicados en el proceso de reconocimiento, es necesario buscar una alternativa para poder obtener esta información.

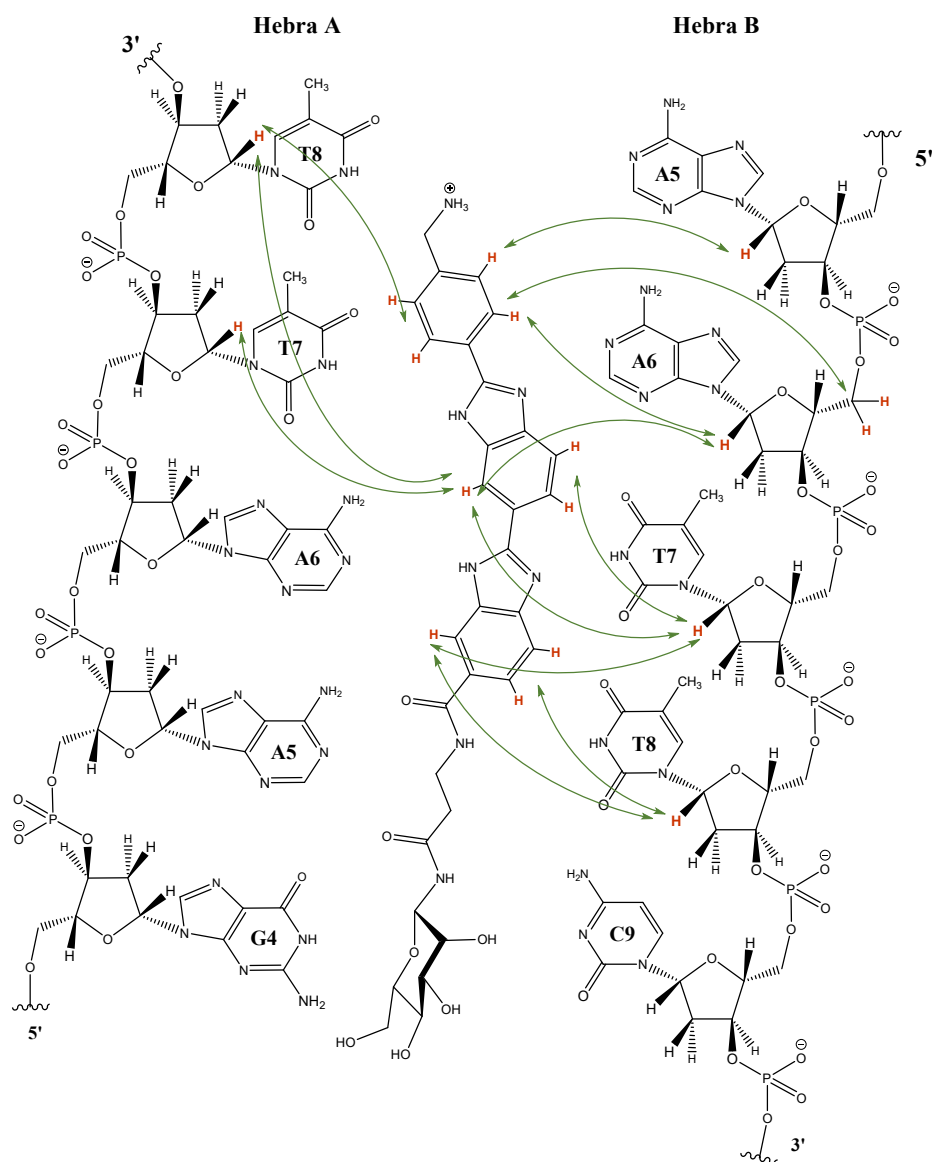


Figura 4.12 Representación esquemática de los nOes ligando - oligonucleótido detectados en el espectro NOESY

4.3. Asignación del complejo formado por el ligando bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Man-¹³C₆ (10) con A₂T₂

La alternativa propuesta para lograr encontrar el sitio de interacción del carbohidrato, es preparar un ligando cuyo carbohidrato esté marcado con ¹³C. De esta manera será posible detectar sus resonancias a través de un experimento HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) y sus interacciones con el oligonucleótido a través de experimentos bidimensionales y tridimensionales que impliquen una transferencia de magnetización a estos carbonos marcados.

El marcaje con ^{13}C se ha empleado muy frecuentemente en la elucidación estructural de proteínas, sin embargo, en el caso de los carbohidratos este uso ha sido menor a pesar de que el problema de solapamiento de señales es más frecuente en este caso. Una de las causas del menor empleo de carbohidratos uniformemente marcados es que es necesario desarrollar experimentos de RMN que supriman los acoplamientos ^{13}C - ^{13}C para poder extraer información estructural útil. En los últimos años se han adaptado experimentos de RMN originalmente ideados para la elucidación de proteínas a la determinación estructural de carbohidratos marcados con ^{13}C .⁷⁴ Además, recientemente se han desarrollado también experimentos de RMN que han permitido detectar interacciones proteína – carbohidrato empleando azúcares uniformemente marcados con ^{13}C .⁷⁵

Por tanto, en nuestro grupo de investigación hemos decidido emplear esta metodología para poder detectar interacciones entre el carbohidrato presente en nuestros ligandos y el surco menor del oligonucleótido A_2T_2 estudiado. Para ello, se ha escogido sintetizar y estudiar el ligando bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man- $^{13}\text{C}_6$ (**10**). Al tratarse del enantiómero del derivado bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Man (**9**) estudiado anteriormente, se va a poder comparar la estructura de dos complejos diastereoméricos (**9** - A_2T_2 y **10** - A_2T_2), además de tratar de localizar la región del surco menor de A_2T_2 en la que se aloja el carbohidrato.

Tal como se realizó con el complejo estudiado anteriormente, el primer paso es formar el complejo 1:1 y llevar a cabo la asignación de sus resonancias, siguiendo el mismo procedimiento. En primer lugar, se identificaron los residuos de citosina y timina en el espectro TOCSY (Figura 4.13) y a partir de ahí se pudo seguir la conectividad de ambas hebras del oligonucleótido gracias al espectro NOESY (Figura 4.14).

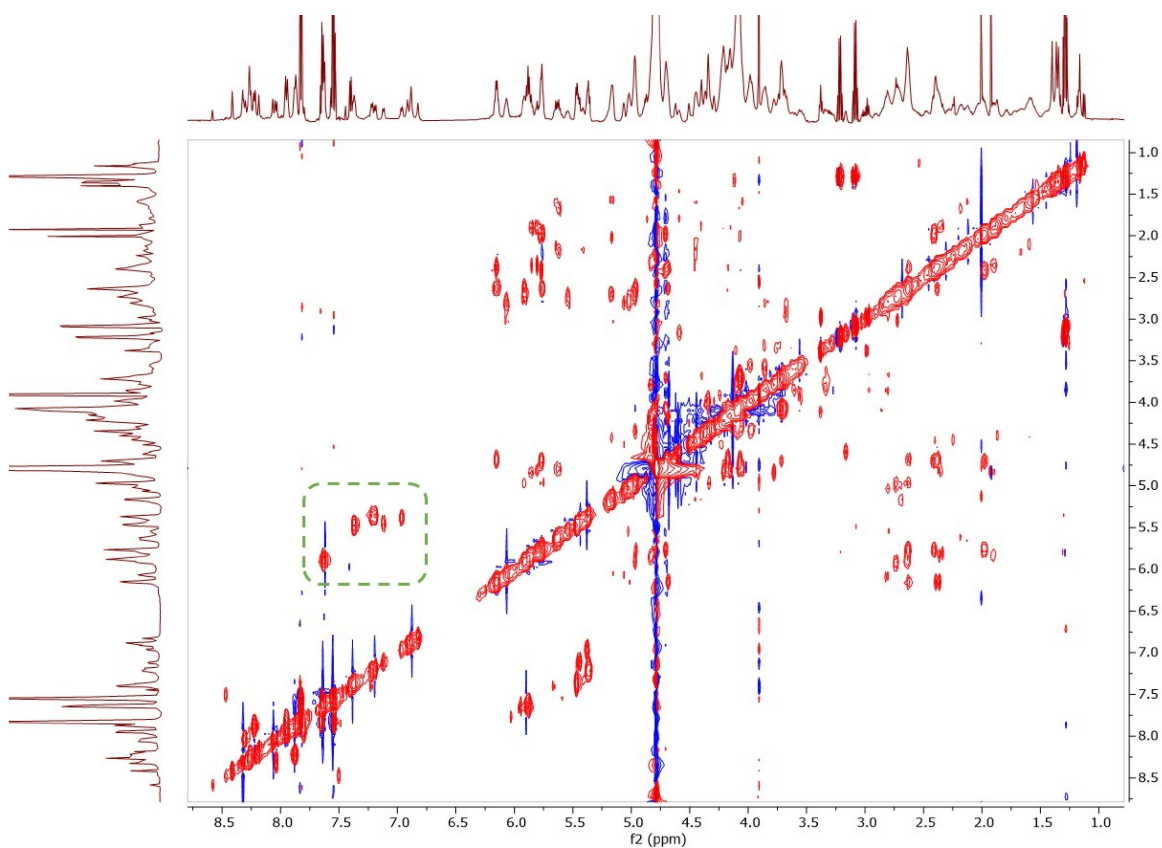


Figura 4.13 Espectro TOCSY (tiempo de mezcla 70 ms) en D₂O del complejo formado por y A₂T₂ y el ligando bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Manosa-¹³C₆ (**10**)

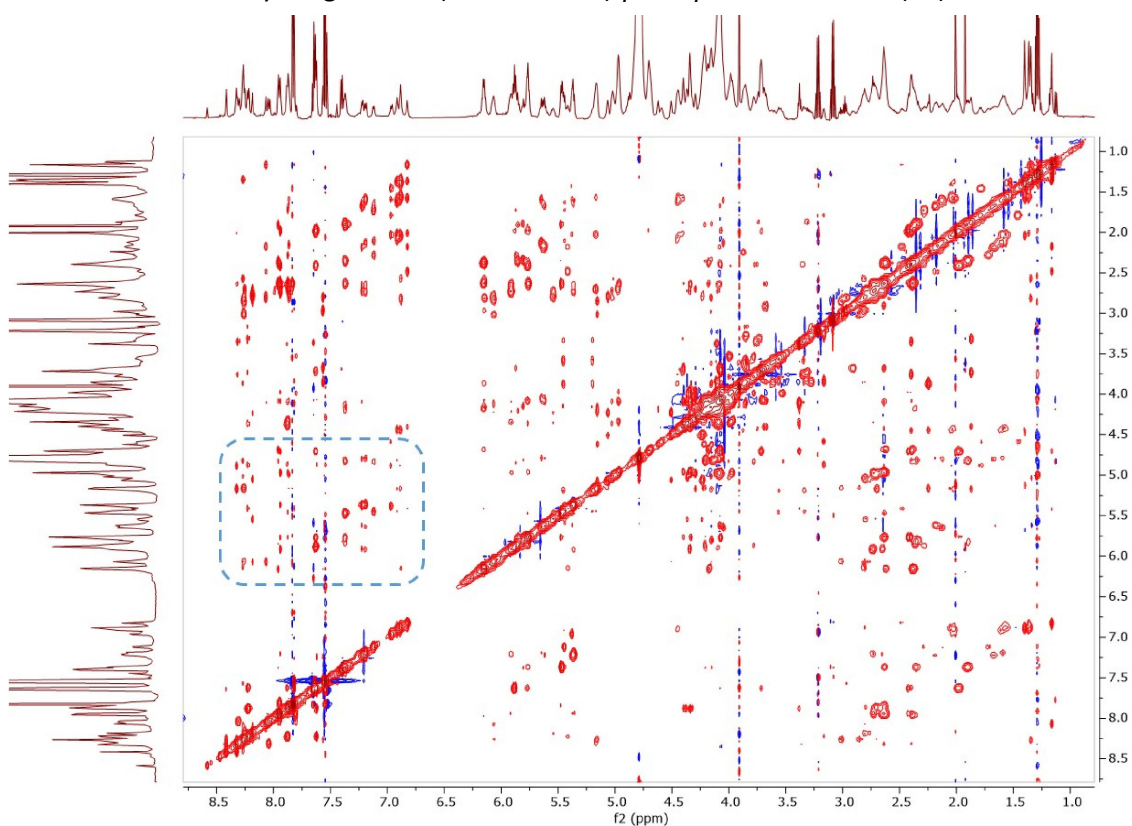


Figura 4.14 Espectro NOESY del complejo formado entre A₂T₂ y el ligando bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Manosa-¹³C₆ (**10**) (tiempo de mezcla 200 ms) en D₂O.

En este caso, si se ha logrado asignar por completo ambas hebras del oligonucleótido (la asignación se muestra en el Anexo). En la Figura 4.15 se observa parte de la conectividad a través de los picos de cruce en el espectro NOESY entre los protones H6 y H8 de las bases y los protones H1' de las desoxirribosas de cada una de las hebras del oligonucleótido. Además, también se han encontrado nOes entre las resonancias del oligonucleótido y la parte aromática del ligando, al igual que sucedía en el complejo diastereomérico con el derivado de β -L-Manosa, lo que permite ubicar la posición del vector en el complejo.

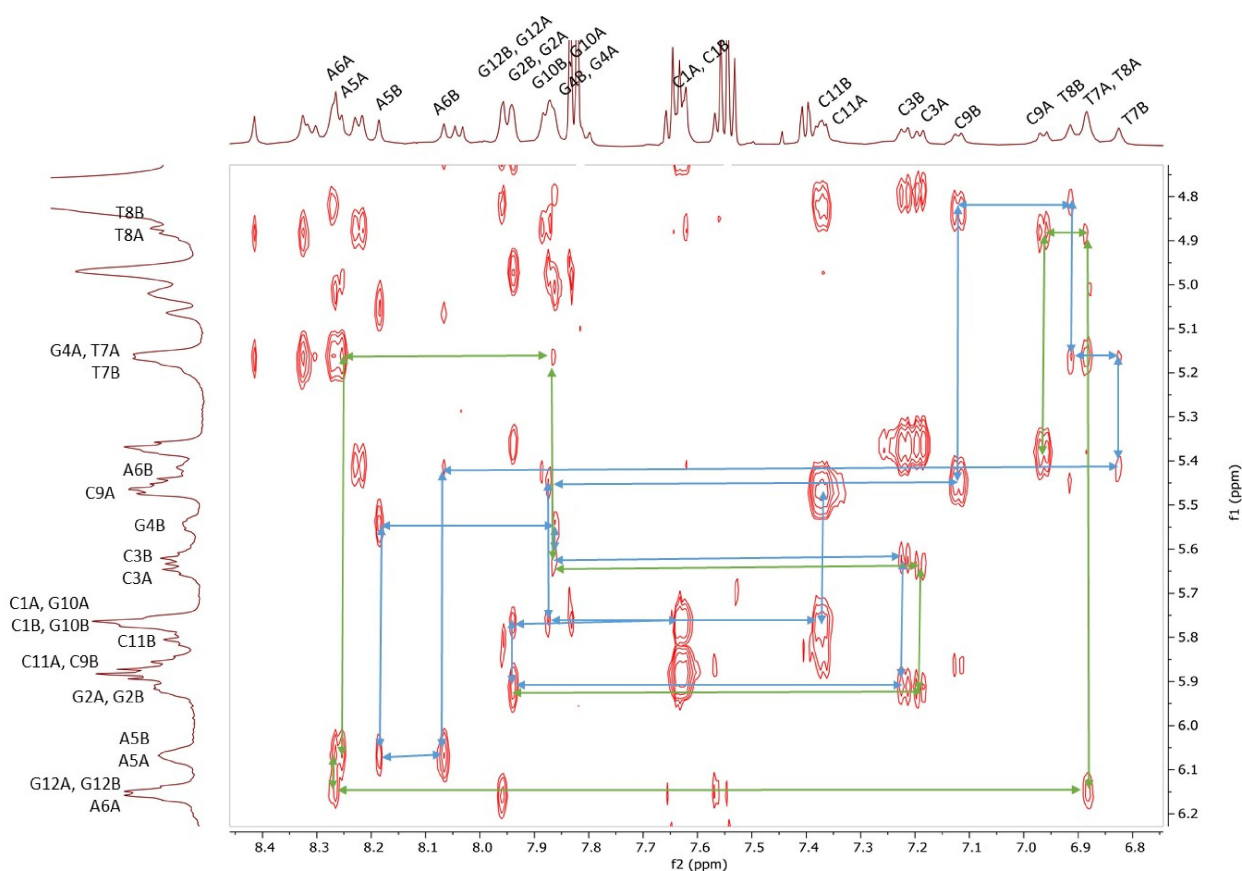


Figura 4.15 Conectividad entre las resonancias de los protones H6 y H8 de las bases nitrogenadas y los protones anoméricos de las desoxirribosas. Cada color representa la conectividad de cada hebra (en verde la hebra A y en azul la hebra B)

A partir de esta elucidación completa pueden calcularse los desplazamientos químicos que sufren las resonancias del oligonucleótido y determinar la posición del vector en el complejo. Como se puede observar en la Figura 4.16, la zona de interacción del vector corresponde con la parte central del oligonucleótido, mostrando de nuevo su predilección por la secuencia AATT. Este diagrama de desplazamientos químicos inducidos es muy similar al obtenido para el complejo con el derivado de β -L-Manosa (9), solo que más completo, por lo que se puede concluir que ambos derivados

mantienen un mismo modo de unión al oligonucleótido, corroborando lo observado por CD en el capítulo 3.

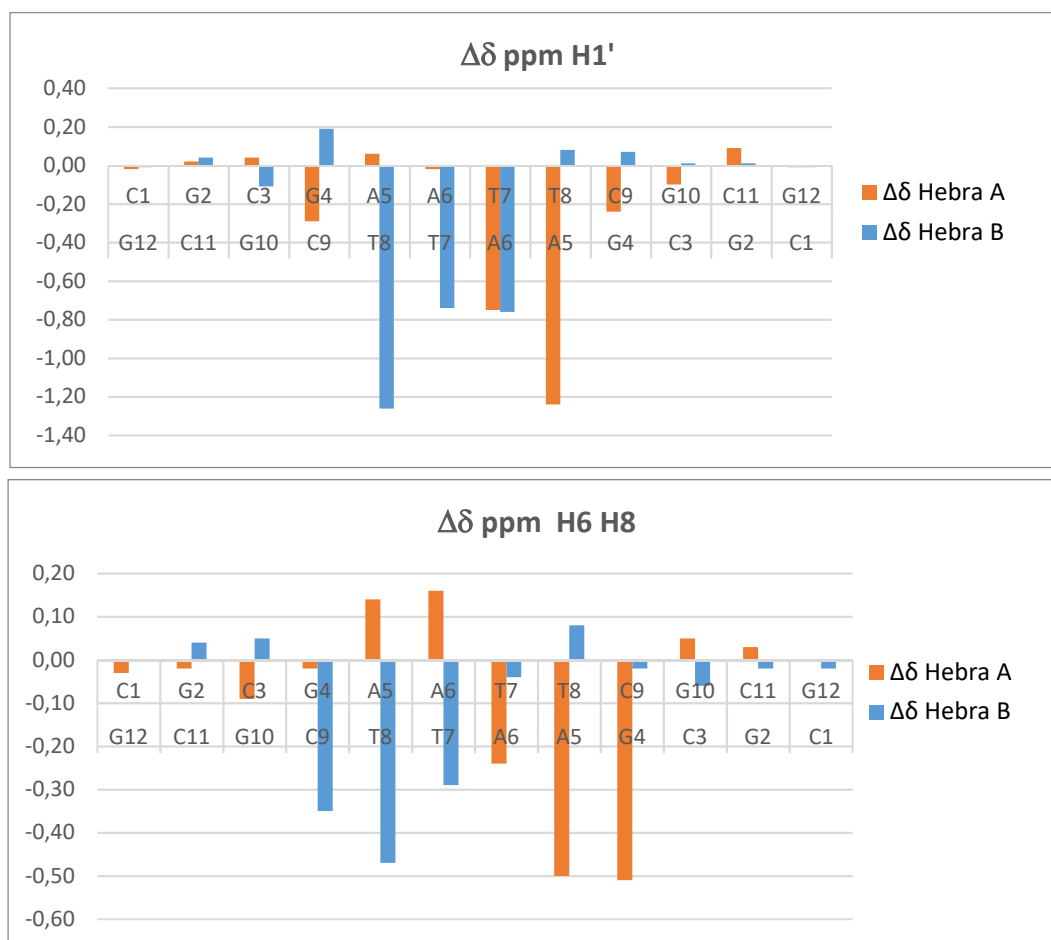


Figura 4.16 Desplazamiento químico inducido de los protones anoméricos de las desoxirribosas (H1') y de los aromáticos de las bases nitrogenadas (H6 y H8) para ambas hebras en el complejo bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man- $^{13}\text{C}_6$ - A $_2$ T $_2$

La siguiente etapa de este estudio es conocer la posición del carbohidrato marcado. Para ello, en primer lugar se realizó un espectro HSQC del complejo, con el objetivo de asignar cada uno de los picos de cruce y conocer el desplazamiento químico en el que aparecen cada uno de los carbonos del carbohidrato en el complejo (Figura 4.17). Dado que únicamente los carbonos del carbohidrato se encuentran marcados, en el espectro solo se observan los picos de cruce correspondientes al azúcar.

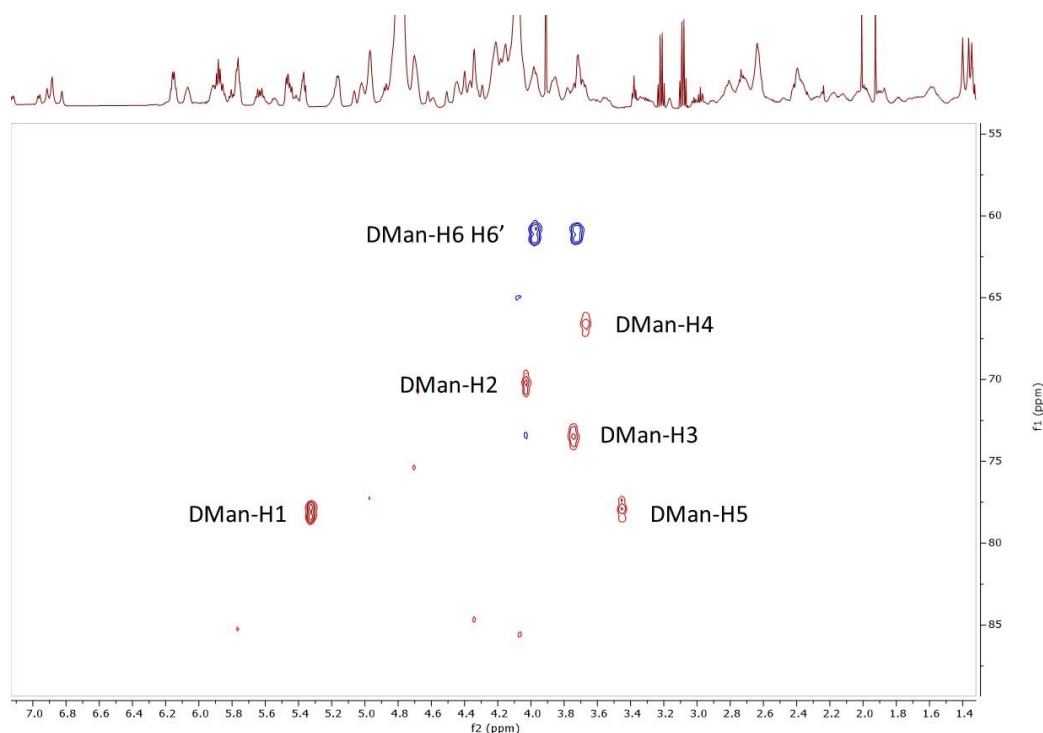


Figura 4.17 Espectro HSQC en D₂O del complejo formado entre A₂T₂ y el ligando bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Manosa-¹³C₆ (**10**)

Una vez asignados los carbonos es posible realizar experimentos más complejos, en concreto, se va a emplear el 3D NOESY-HSQC. Este experimento está diseñado específicamente para obtener un espectro NOESY de biomoléculas marcadas y de complejos biomolécula-ligando, a partir de los cuales se pueden asignar claramente sus nOes incluso en regiones con mucho solapamiento. En este experimento, en primer lugar, se transfiere la magnetización entre todos los protones por nOe, después esta magnetización se transfiere a los carbonos vecinos y, por último, vuelve al protón para su detección.

En la visualización de este espectro, los picos de cruce se muestran en forma de cubo con las dimensiones ¹H, ¹H y ¹³C. Para poder interpretarlo más fácilmente, se selecciona la frecuencia a la que se encuentra el carbono de interés, resultando un espectro ¹H - ¹H bidimensional. En él, aparece el pico de cruce HSQC correspondiente al protón unido a dicho carbono y varios picos de cruce adicionales correspondientes a los nOes de ese protón. De esta forma se obtiene un espectro muy limpio y fácil de asignar.

En el caso del complejo formado por bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Manosa-¹³C₆ - A₂T₂, se han encontrado nOes entre algunos de los protones del carbohidrato y el oligonucleótido. En concreto, los nOes encontrados han sido entre los protones H1 y H2

de la β -D-Manosa con el protón anomérico de la desoxirribosa A5-A, el protón H2 de la Manosa con el protón G4-H4'A y de los protones H6 y H6' de la Manosa con el protón G10-H1'-B (Figura 4.18). Esto ya prueba que el carbohidrato se encuentra en el surco menor de este oligonucleótido y además permite determinar su ubicación en la estructura del complejo.

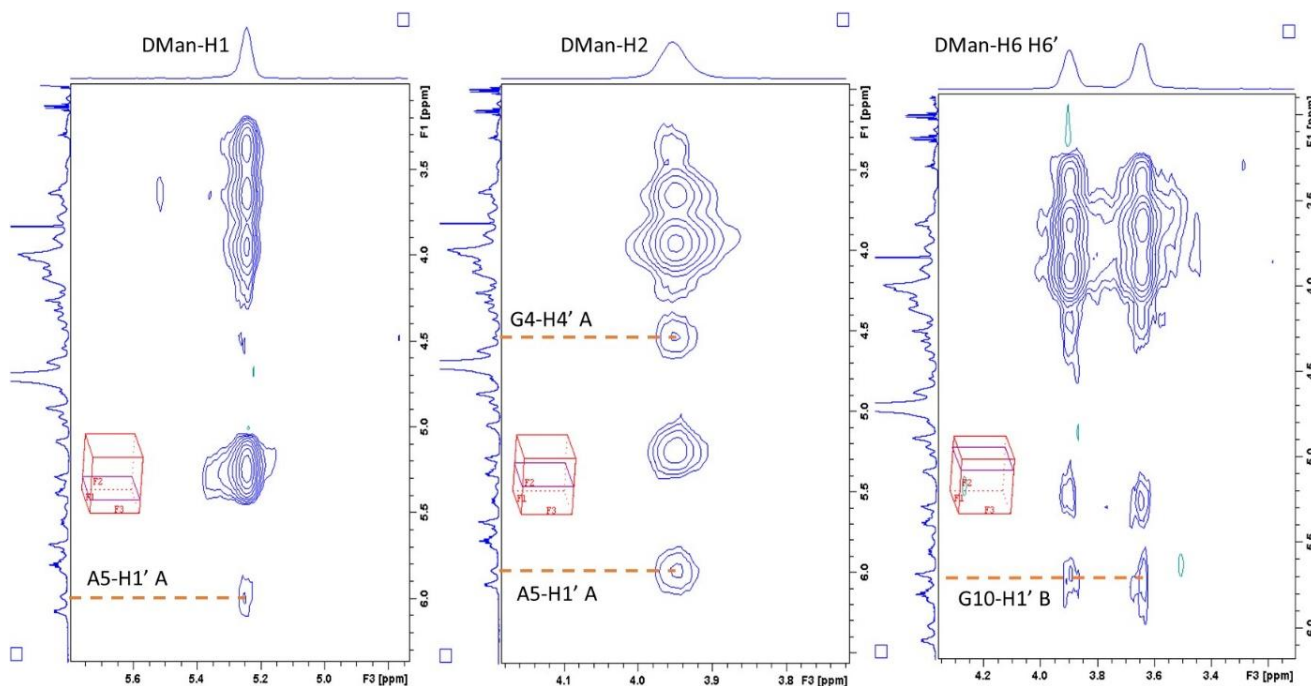


Figura 4.18 Detalle del espectro 3D NOESY-HSQC en D_2O del complejo formado entre A_2T_2 y el ligando bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa- $^{13}C_6$ (**10**) (tiempo de mezcla 200 ms).

Adicionalmente, se ha realizado un experimento nuevo, el 1H , ^{13}C -HSQC-NOESY para aplicarlo por primera vez al estudio de la interacción carbohidrato - ADN.⁷⁵ Este es un experimento bidimensional 1H - ^{13}C que muestra la conectividad a través de enlaces al igual que el experimento HSQC, pero además también muestra si hay efecto nOe entre los protones unidos a los carbonos marcados con el resto de protones. Es decir, en la frecuencia correspondiente a cada carbono, se muestra tanto el pico de cruce correspondiente al HSQC como los protones cercanos espacialmente al protón de ese carbono que muestren efecto nOe.

En la Figura 4.19 se muestra parte del espectro 1H , ^{13}C -HSQC-NOESY en el que aparecen los picos de cruce HSQC del carbohidrato marcado. En la frecuencia de cada carbono aparecen además los picos de cruce NOESY que presenta cada protón del carbohidrato. Se observan las correlaciones típicas de la Manosa (nOes entre H1, H3 y H5, entre H1 con H2 y entre H5 con H6 y H6') y también puede verse que hay efecto nOe

entre el carbohidrato y algunos de los protones del oligonucleótido. En concreto se observa efecto nOe entre los protones H1 y H2 de la Manosa con G4-H4'-A, entre el protón H2 de la Manosa y el protón anomérico de la desoxirribosa A5-A y los protones H6 y H6' de la Manosa con el protón G10-H4'-B, al igual que se vio en el espectro 3D NOESY HSQC, confirmando así la existencia de dichas distancias cortas y la presencia del carbohidrato en el surco menor y demuestra que la región de la Manosa cercana a la Adenina A5-A (que cuenta con aceptores de enlace de hidrógeno) es la posición 2 (posición en la que se encontraría el hidroxilo con un dador de enlace de hidrógeno cooperativo).

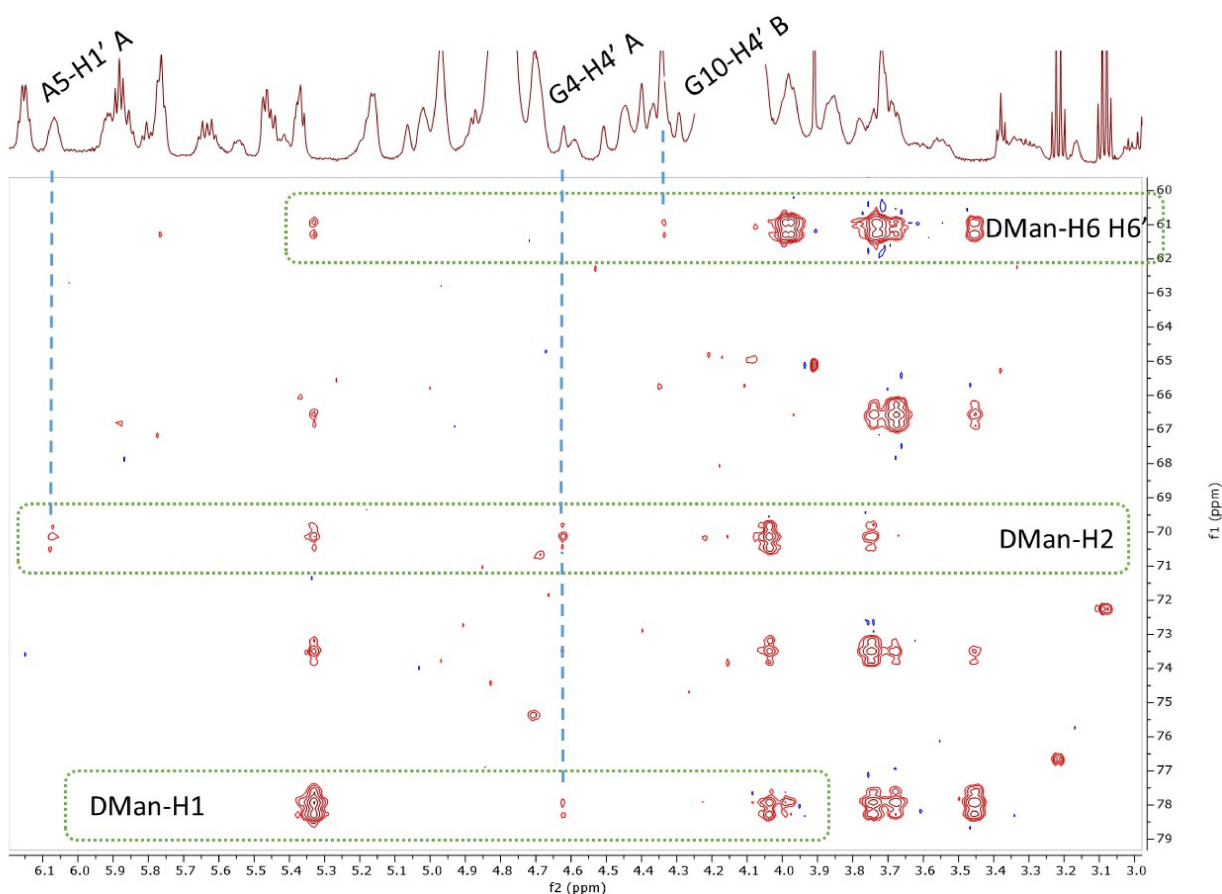


Figura 4.19 Detalle del espectro ^1H , ^{13}C -HSQC-NOESY en D_2O del complejo formado entre A_2T_2 y el ligando bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa- $^{13}\text{C}_6$ (**10**) (tiempo de mezcla 200 ms).

Con la información obtenida a través del espectro NOESY, donde se encontraron nOes entre la parte aromática del vector y la información que han aportado los experimentos 3D NOESY-HSQC y ^1H , ^{13}C -HSQC-NOESY acerca de la ubicación del carbohidrato, es posible reconstruir el lugar que ocupa el ligando completo dentro del complejo con el oligonucleótido A_2T_2 .

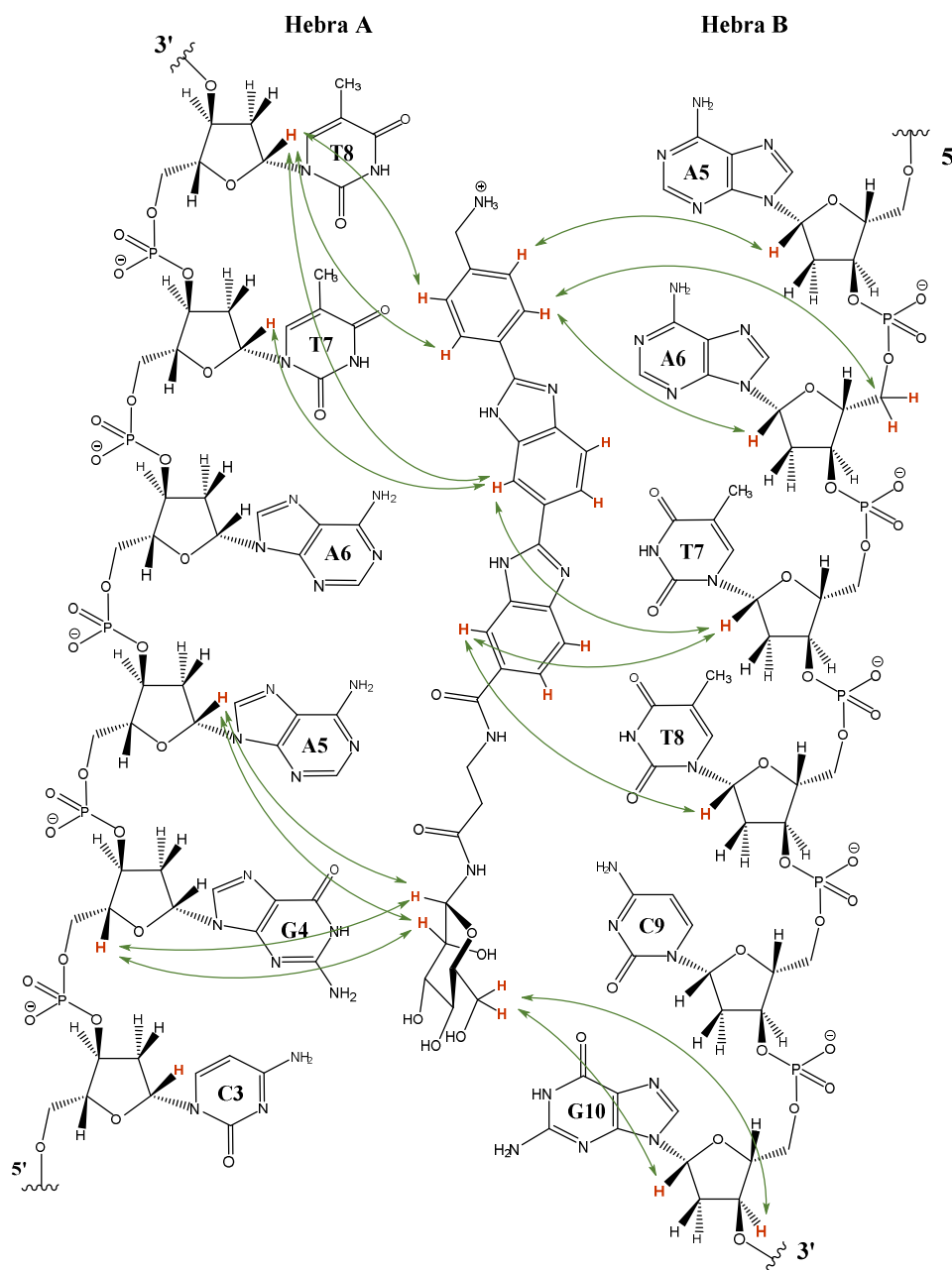


Figura 4.20 Representación esquemática de los nOes ligando - oligonucleótido detectados en los espectros 2D NOESY, 3D NOESY-HSQC y ^1H , ^{13}C -HSQC-NOESY del complejo A_2T_2 - bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man- $^{13}\text{C}_6$ (**10**)

Como se puede apreciar en la Figura 4.20, la posición de la parte aromática del vector es idéntica a la que se encontró en el complejo diastereomérico del derivado de β -L-Manosa (**9**). En este caso, sin embargo, sí se ha logrado determinar la posición del carbohidrato en el complejo gracias al empleo del azúcar marcado con ^{13}C . Su lugar de interacción está situado justo a partir del sitio de interacción del vector y abarca hasta 3 pares de bases.

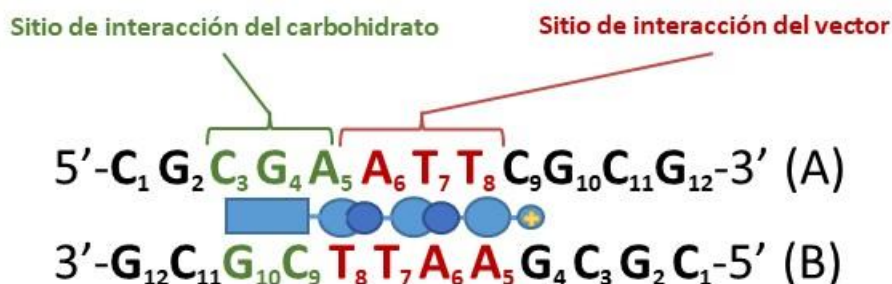


Figura 4.21 Representación esquemática de la posición del ligando dentro del complejo con A₂T₂ y los sitios de interacción del vector y el carbohidrato

Es muy interesante destacar que ambos ligandos enantiómeros derivados de β -Manosa (**9** y **10**) se disponen en el complejo formado con el oligonucleótido A₂T₂ de la misma manera. Es decir, el cambio en la quiralidad del carbohidrato genera dos complejos diastereoméricos con A₂T₂ en los que el vector ocupa pares de bases idénticos con los mismos nOes observados. Dado que en los dos casos el vector se dispone en la misma región del oligonucleótido, podemos afirmar que las diferencias observadas en las constantes de afinidad por CD (capítulo 3) se deben exclusivamente a interacciones específicas de los carbohidratos β -D-Man y β -L-Man con las bases A₅-A, G₄-A y G₁₀-B del oligonucleótido.

En concreto, para esta pareja de enantiómeros la diferencia en la estabilidad del complejo que forman con A₂T₂ es de 0.4 Kcal/mol, siendo más estable el complejo formado con el derivado de β -L-Man. Sin embargo, en el caso de los derivados de Glucosa con A₂T₂, esta diferencia es de 1.0 Kcal/mol, una diferencia muy significativa, siendo más estable el complejo formado con el derivado de β -L-Glc.

Es muy interesante destacar que los experimentos 3D NOESY-HSQC y ¹H, ¹³C-HSQC-NOESY con el derivado de β -D-Man muestran nOes, (es decir, distancias cortas) entre los protones H1 y H2 de la Manosa y el protón anomérico de la desoxirribosa de A₅-A, indicando que esta región del carbohidrato está cercano al interior del surco menor (los protones anoméricos de las desoxirribosas están orientados hacia el interior del surco menor) y en las inmediaciones de A₅-A, que presenta aceptores de enlace de hidrógeno.

Por otro lado, recordemos que los resultados de la comparación de Kas para los complejos de β -D-Man (**7**) y β -D-Glc (**6**) con A₂T₂ obtenidos en el capítulo anterior mostraron una estabilidad adicional de 0.3 Kcal/mol en favor del derivado de β -D-Man.

Por tanto, poniendo en conjunto la información estructural obtenida en este capítulo y la información cuantitativa sobre la interacción obtenida en el capítulo anterior, todo parece indicar que la cooperatividad de enlace de hidrógeno entre el hidroxilo en posición 2 de la Manosa y la Adenina A5-A está contribuyendo a la estabilización del complejo del derivado bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man (**7** y **10**) con el oligonucleótido A₂T₂.

4.4. Conclusiones

Se ha llevado a cabo el estudio estructural en disolución acuosa del oligonucleótido A₂T₂ en nuestras condiciones experimentales con disolución reguladora de imidazol-*d*₄, así como del complejo que forma con el ligando bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Manosa (**9**).

En dicho estudio se ha logrado obtener información estructural acerca de la ubicación en el complejo de la parte aromática del vector, determinando su posición en las bases centrales AATT del oligonucleótido a través de desplazamientos químicos inducidos y de la observación de nOes oligonucleótido - ligando.

Para conseguir determinar la ubicación del carbohidrato, se ha hecho uso de un derivado cuyo azúcar está uniformemente marcado con ¹³C. El ligando empleado ha sido el bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa-¹³C₆ (**10**).

Haciendo uso de este ligando marcado, se ha logrado poner a punto una metodología empleando experimentos novedosos de RMN como son el 3D NOESY-HSQC y el ¹H, ¹³C-HSQC-NOESY y aplicarlos a la determinación estructural de la interacción carbohidrato - ADN por primera vez. Mediante estos experimentos ha sido posible la detección del carbohidrato en el complejo con A₂T₂, determinando las bases con las que establece su interacción.

Se ha podido comprobar que los ligandos derivados de β -Manosa (**9** y **10**) se disponen de la misma manera en el complejo formado con el oligonucleótido A₂T₂. Gracias a ello, es posible afirmar que las diferencias observadas en las constantes de afinidad por CD (capítulo 3) se deben exclusivamente a interacciones específicas de los carbohidratos.

Se han encontrado indicios que apuntan a que la cooperatividad del enlace de hidrógeno entre la posición 2 de la Manosa y la Adenina A5-A está contribuyendo a la estabilización del complejo del derivado bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man con el oligonucleótido A₂T₂.

Capítulo 5

SÍNTESIS DE LIGANDOS DEL SURCO MENOR DEL ADN

5.1. Introducción

En este capítulo se describe la síntesis de los distintos ligandos glicosilados y el derivado de ciclohexilo que incorporan el vector de bis(benzimidazol) (**1** - **4**, Figura 5.1).

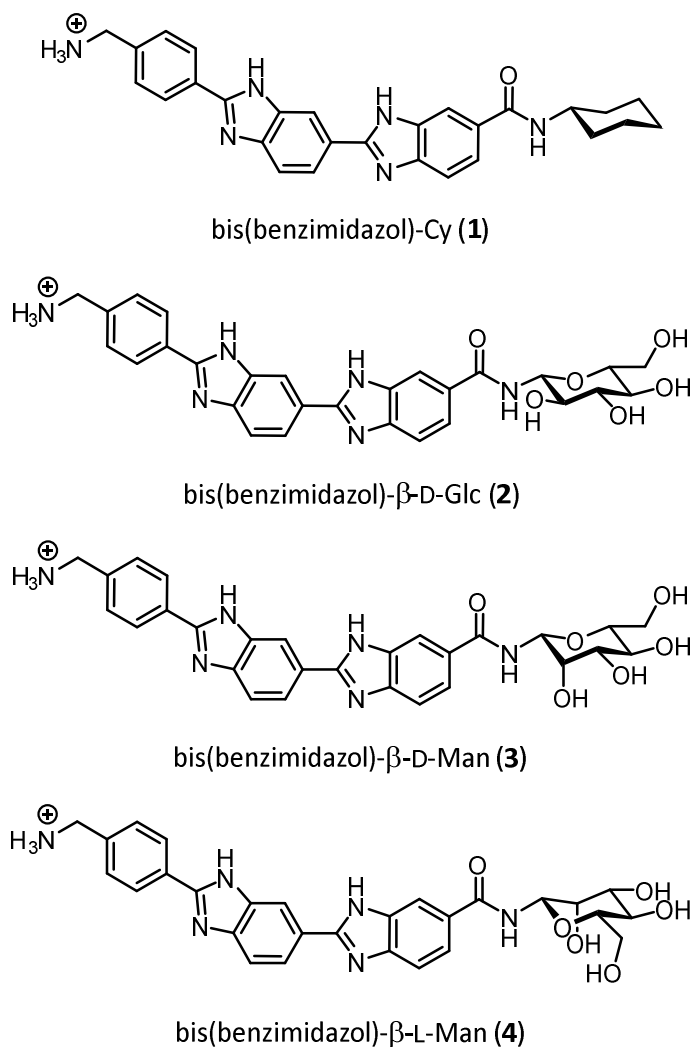


Figura 5.1 Primera familia de ligandos derivados de bis(benzimidazol)

También se describe la síntesis de los ligandos glicosilados, el derivado de ciclohexilo y el derivado con β -D-Manosa uniformemente marcada con ^{13}C que incorporan el espaciador de β -Alanina (**5** - **10**, Figura 5.2).

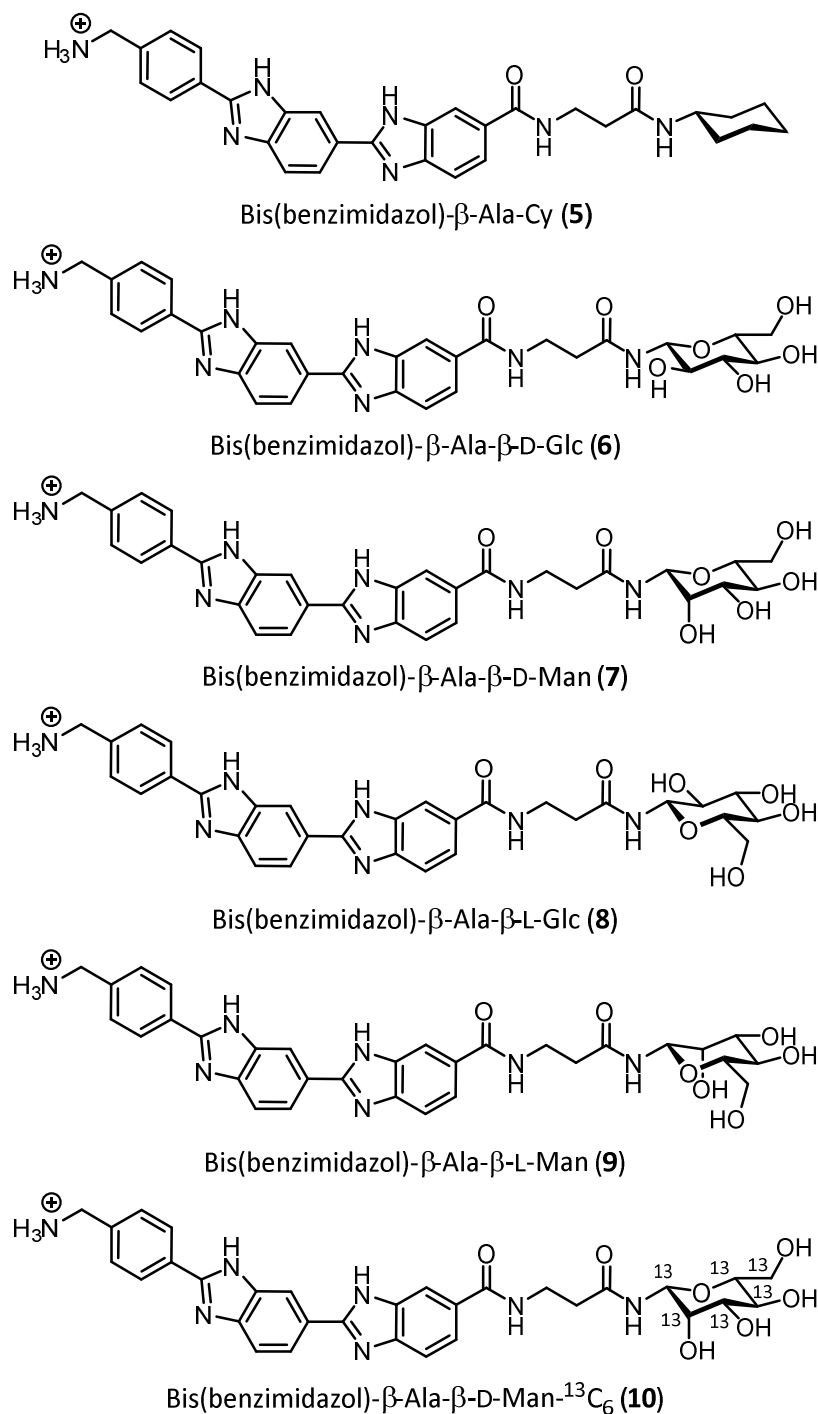


Figura 5.2 Segunda familia de ligandos derivados de bis(benzimidazol) con espaciador de β-Alanina

La estrategia seguida para la preparación de todos los ligandos del ADN que se han estudiado en esta tesis consiste en una síntesis convergente, en la que el vector y el aminoazúcar se sintetizan por separado. De esta forma es posible emplear la metodología desarrollada en el grupo de investigación para la síntesis de carbohidratos con un grupo amino en la posición anomérica. En cuanto a la parte del vector, se va a

seguir el esquema propuesto por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen para su síntesis.⁵⁹ Esta consiste en la condensación de diaminobenzoatos con los correspondientes aldehídos o ácidos para dar lugar a la formación de ambos benzimidazoles.

En la Figura 5.3 se muestra el esquema retrosintético propuesto para la síntesis de los glicoderivados del vector de bis(benzimidazol) (**2** - **4**), siendo la síntesis de la zona aromática idéntica a la propuesta por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen. Para la síntesis del derivado de ciclohexilo (**1**) se sigue el mismo procedimiento, sustituyendo el aminoazúcar por ciclohexilamina.

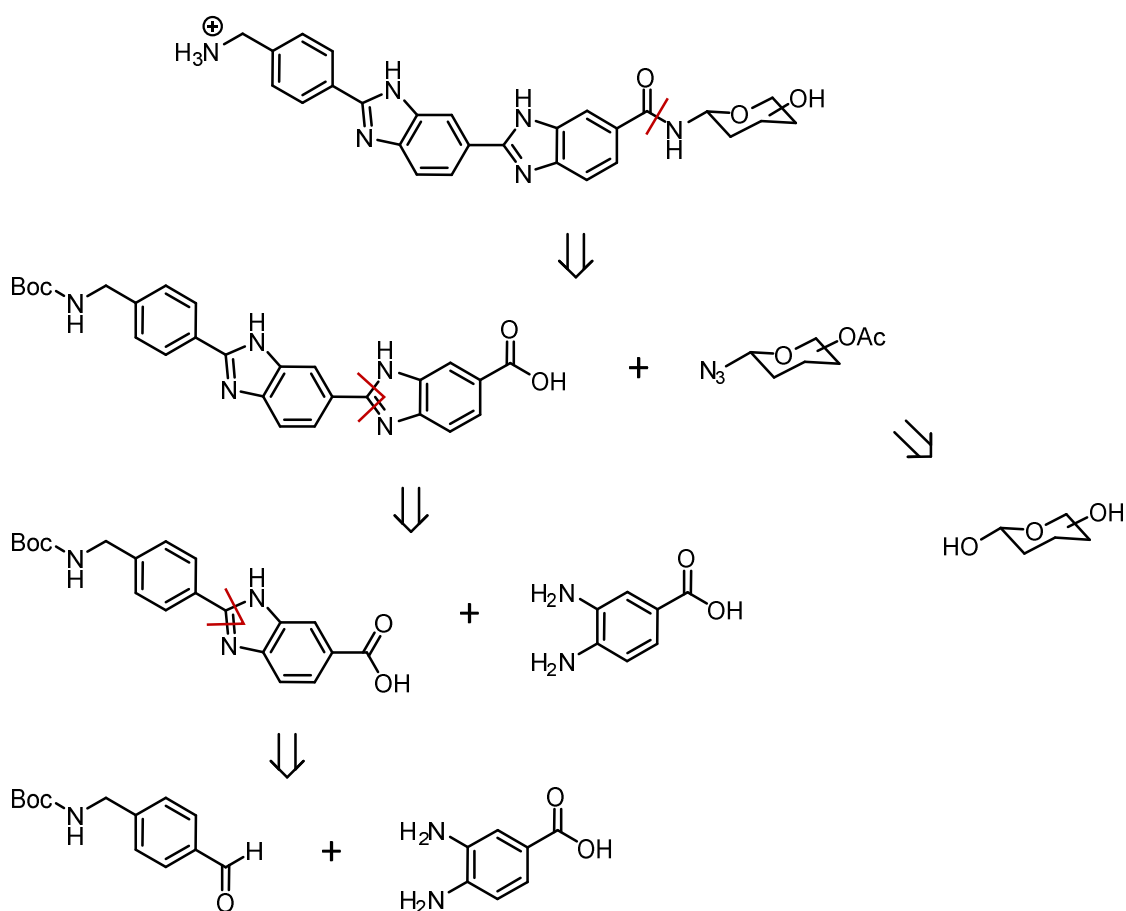


Figura 5.3 Análisis retrosintético de los ligandos con vector de bis(benzimidazol)

En la Figura 5.4, se muestra el esquema retrosintético seguido para la síntesis de los ligandos derivados de bis(benzimidazol) con espaciador de β -Alanina (**5** - **10**).

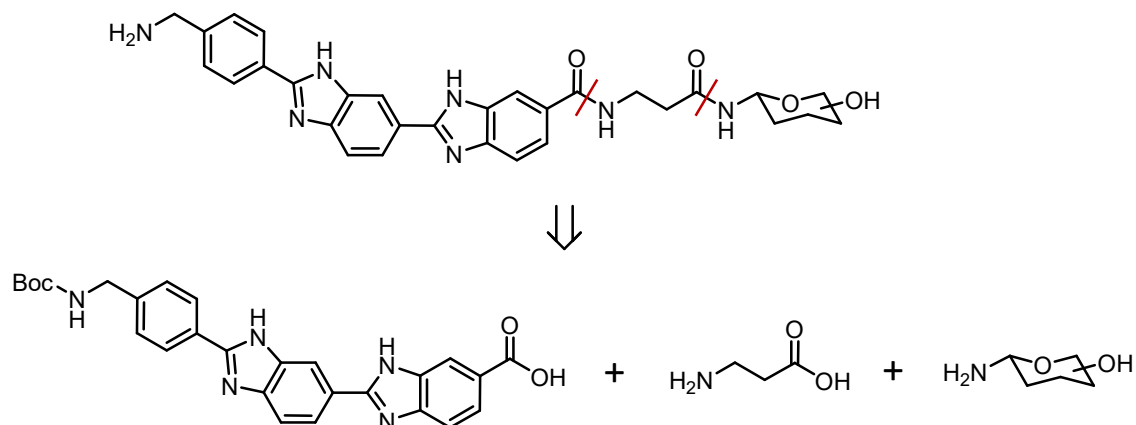


Figura 5.4 Análisis retrosintético de los ligandos con espaciador de β -Alanina

Tradicionalmente, los benzimidazoles se han preparado principalmente a través de la reacción de 1,2-diaminobencenos con ácidos carboxílicos bajo condiciones fuertemente deshidratantes como el empleo de ácido polifosfórico, ácido clorhídrico o ácido *p*-toluensulfónico.⁷⁶ Sin embargo, el uso de reactivos más suaves, como ácidos de Lewis,⁷⁷ ha mejorado el rendimiento y la pureza de la reacción.⁷⁸ Por otro lado, la síntesis de benzimidazoles a través de la condensación de 1,2-diaminobencenos con aldehídos requiere un oxidante para generar el núcleo de benzimidazol. Algunos oxidantes como nitrobenzoceno, benzoquinona, óxidos de mercurio, tetra acetato de plomo, yodo o Fe (III) se han empleado para ello.⁷⁹ Sin embargo, estos métodos no siempre son compatibles con cualquier material de partida y también tienen dificultades prácticas y laboriosos métodos de purificación.

En la ruta sintética presentada por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen para la formación de los núcleos de benzimidazol, se emplea nitrobenzoceno a altas temperaturas en ambas etapas de condensación, siendo un reactivo extremadamente tóxico cuyo empleo es deseable evitar. Además, estas reacciones son de larga duración y producen rendimientos moderados. Por todo ello, es necesario plantear unas condiciones de reacción alternativas para la obtención de estos derivados.

Otro punto a tener en cuenta en la síntesis de estos derivados es la elección de los grupos protectores, tanto del grupo amino del vector como de los hidroxilos de los carbohidratos. Como es habitual a la hora de seleccionar grupos protectores, se evaluaron las condiciones de reacción de todas las etapas, así como el resto de grupos funcionales presentes en toda la ruta sintética. Además, lo ideal es que los grupos protectores se puedan eliminar en condiciones suaves, rápidas y con subproductos

fáciles de eliminar, facilitando la purificación de los productos finales. En el azúcar se emplearon grupos acetato para la protección de los hidroxilos, cuya desprotección tiene lugar empleando metóxido sódico como catalizador.⁸⁰ En cuanto al grupo protector del grupo amino, se empleó el grupo *tert*-butiloxicarbonilo (BOC), empleado por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen en su síntesis, que es compatible con todas las etapas de esta ruta sintética. Su eliminación es muy rápida y sencilla en medio ácido, sin embargo, es necesario escoger cuidadosamente estas condiciones de desprotección ya que puede tener lugar una anomerización del carbohidrato. Esta anomerización se puede evitar empleando ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano.

5.2. Síntesis de los ácidos del vector de bis(benzimidazol) y del vector con espaciador de β -Alanina (15 y 17)

La primera etapa de la síntesis del vector consiste en la formación del primer núcleo de benzimidazol. Como hemos comentado, en la ruta sintética presentada por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen esta etapa se realizaba empleando nitrobenzoceno y calefacción, metodología que queremos evitar en nuestra síntesis. En la literatura se ha empleado con éxito el ion bisulfito en la condensación de aldehídos con diamino derivados, haciendo que la formación de núcleos de benzimidazol sea muy fácil.⁸¹ Así, en esta tesis mediante calefacción convencional, esta reacción tarda 24 horas en completarse. Sin embargo, esta metodología se ha podido hacer más eficiente gracias al empleo de calefacción por microondas, completándose en un tiempo de 40 minutos.

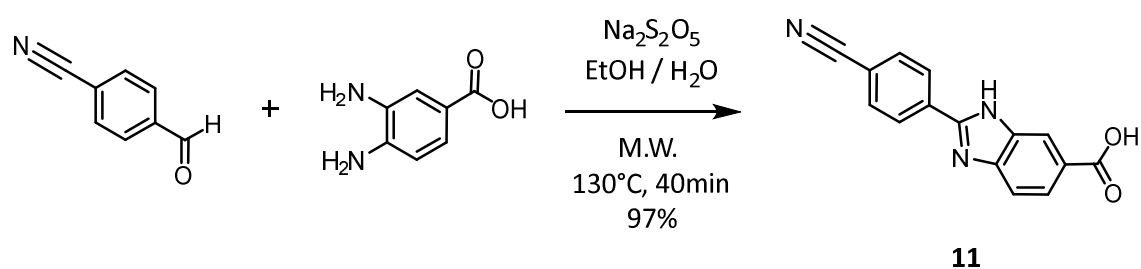


Figura 5.5 Formación del primer núcleo de benzimidazol

De esta manera, se logra obtener el primer núcleo de benzimidazol mediante la condensación de 4-formilbenzonitrilo y ácido 3,4-diaminobenzoico sin emplear reactivos tóxicos y con un 97% de rendimiento (Figura 5.5). Además, el producto deseado **11** precipita directamente en el medio de reacción, por lo que se obtiene puro simplemente por filtración. Se puede confirmar la obtención del producto **11** por la

observación en ^1H -RMN de la resonancia del protón del NH del benzimidazol a 13.47 ppm en $\text{DMSO}-d_6$.

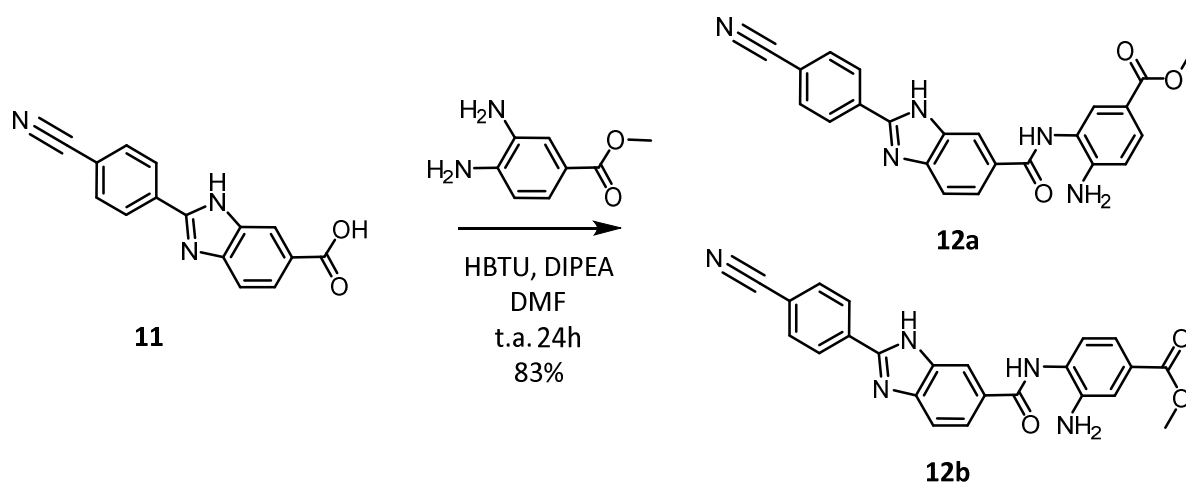


Figura 5.6 Formación del enlace amida entre el ácido **11** y 3,4-diaminobenzoato de metilo

Para la formación del segundo benzimidazol, se realiza el acoplamiento del ácido **11** con 3,4-diaminobenzoato de metilo. Esta reacción tiene lugar empleando como agente de acoplamiento HBTU en presencia de la base de Hünig (*N,N*-diisopropiletilamina, DIPEA (Figura 5.6)).⁸² En esta reacción, el ácido desprotonado reacciona con el HBTU para dar lugar al ácido activado, que a su vez reacciona con la amina para dar lugar a la amida correspondiente (Figura 5.7).⁸³ Durante el proceso se genera urea como subproducto, que, a su vez, es la fuerza motriz del proceso.

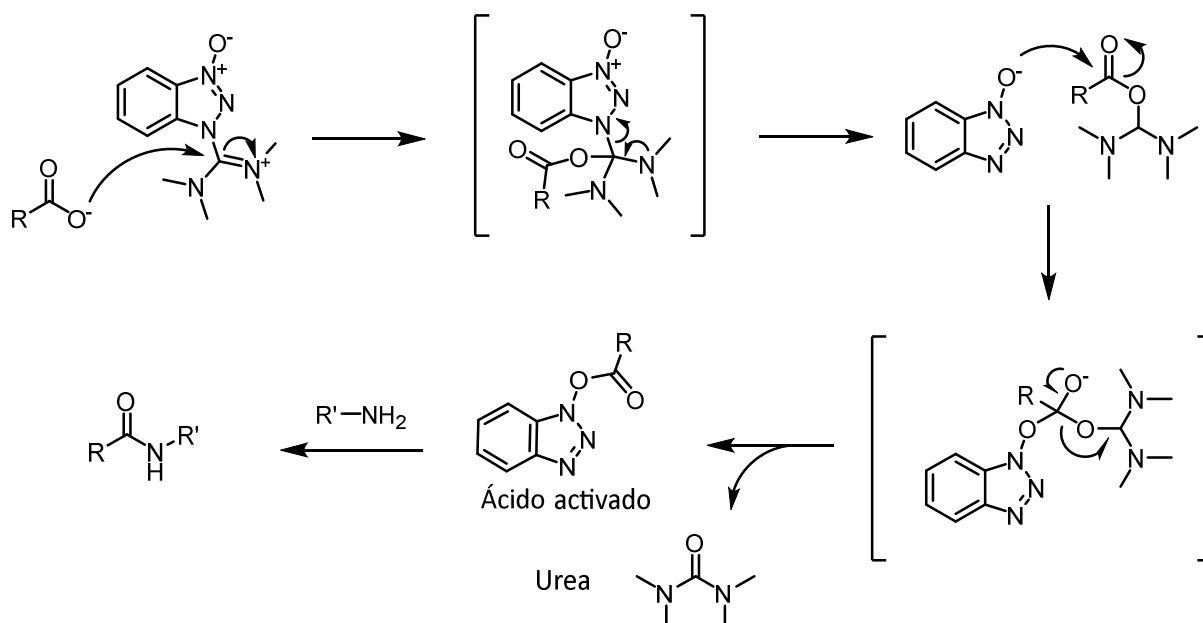
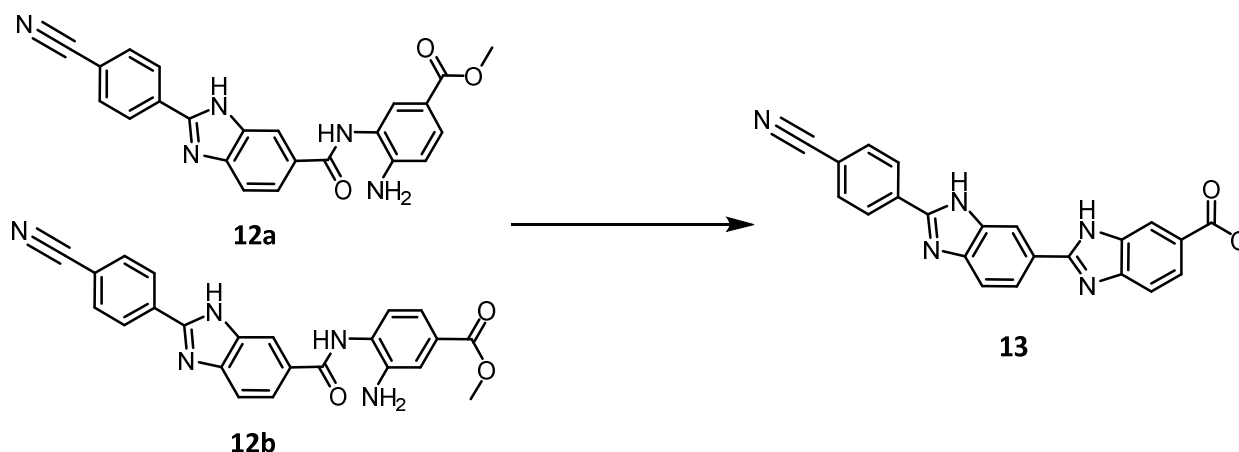


Figura 5.7 Mecanismo de activación del ácido empleando HBTU y acoplamiento con una amina

Por tanto, la reacción, como se muestra en la Figura 5.6, conduce a la formación de la mezcla de productos **12a** y **12b**. Se han asignado los protones aromáticos del aminobenceno de ambos productos por ^1H -RMN en $\text{DMSO}-d_6$. La integral de estos protones mostro una proporción 1:1. En principio, el hecho de obtener en una reacción una mezcla de isómeros como esta podría suponer un problema, pues sería muy difícil su separación. Sin embargo, en la siguiente etapa de síntesis (Figura 5.8), la condensación que tiene lugar entre el carbonilo y el grupo amino libre en ambos compuestos (**12a** y **12b**), conduce a la formación de un mismo producto **13**.

En la ruta sintética presentada por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen, esta reacción de condensación tiene lugar empleando de nuevo nitrobenzeno a altas temperaturas durante 24 horas, condiciones que tratamos de evitar. Para ello, la metodología utilizada inicialmente en el grupo para completar esta reacción fue emplear ácido acético y calefacción, obteniéndose **13** con un 72 % de rendimiento tras 24 horas de reacción. Para intentar acortar el tiempo de reacción se empleó calefacción por microondas. Sin embargo, el rendimiento de la reacción disminuyó hasta el 53%, detectándose la presencia de subproductos de reacción.

En la literatura se ha descrito una metodología para la formación de benzimidazoles en medio acuoso que emplean fosfatos como grupo saliente en la condensación.⁸⁴ En nuestro caso, hemos modificado las condiciones iniciales empleando NaH_2PO_4 en ácido acético/agua y calefacción por microondas, disminuyendo así el tiempo de reacción a una hora con un rendimiento casi cuantitativo. Cabe destacar también que el producto deseado **13** se obtiene puro por precipitación, por lo que esta metodología no precisa purificaciones adicionales. Se puede seguir la reacción por ^1H -RMN en $\text{DMSO}-d_6$ observando la desaparición de la resonancia del grupo amino.



Disolvente	Aditivo	Temperatura	Tiempo	Rendimiento
Ác. acético	-	140 °C	24 h	72 %
Ác. acético	-	160 °C (M.W.)	2 h	53 %
Ác. Acético / H ₂ O	NaH ₂ PO ₄	140 °C	24 h	90 %
Ác. Acético / H ₂ O	NaH ₂ PO ₄	150 °C (M.W.)	1 h	99 %

Figura 5.8 Condiciones de reacción para la formación del segundo núcleo de benzimidazol

La siguiente etapa de síntesis es la reducción del grupo nitrilo a amina y su protección con el grupo *tert*-butiloxicarbonilo (BOC). Para ello, se ha empleado una metodología que utiliza una sal de níquel como catalizador y borohidruro sódico (Figura 5.9).⁸⁵ Esta reacción, aunque tiene un rendimiento moderado, es muy rápida y extremadamente limpia, obteniéndose de nuevo el producto **14** puro por precipitación. El mayor inconveniente de esta reacción es la eliminación completa del níquel, pues su presencia, aún a muy baja concentración, puede presentar problemas en las siguientes etapas de reacción. Para su total eliminación es necesario lavar el producto sólido varias veces con dietilentriamina. Se puede confirmar la obtención del producto **14** por la aparición en ¹H-RMN de las resonancias del grupo *tert*-butilo (1.42 ppm) y del NH del carbamato (7.78 ppm). Además, en IR se observa la desaparición de la banda correspondiente al grupo nitrilo a 2230 cm⁻¹.

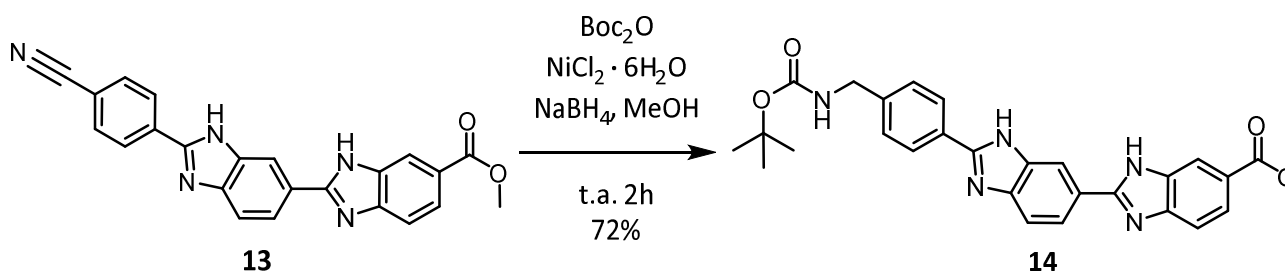


Figura 5.9 Reducción del grupo nitrilo a amina y protección con BOC

El siguiente paso en la síntesis es la hidrólisis del éster **14** con una disolución acuosa de KOH 1M en etanol. De nuevo, mediante el empleo de calefacción por microondas, el tiempo necesario para completar esta reacción se reduce de 2 horas⁵⁹ a 30 minutos (Figura 5.10).

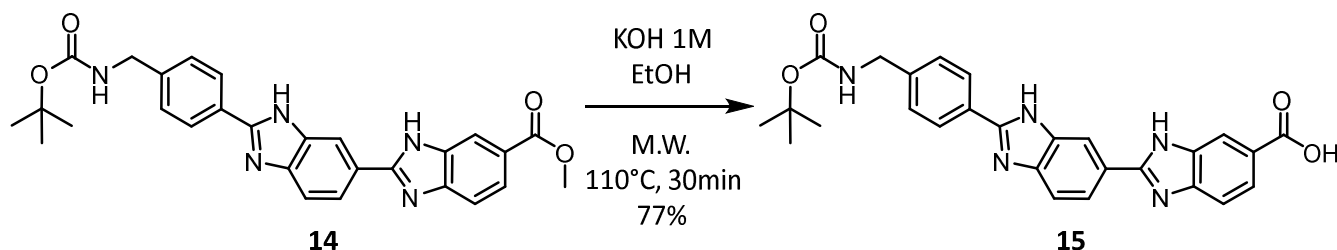


Figura 5.10 Hidrólisis en medio básico del éster **14**

La ruta de síntesis hasta el ácido **15** estaba descrita por el Prof. Nielsen con un rendimiento global del 23% y una duración total acumulada de 80 horas en cinco etapas de reacción. Las modificaciones que se describen en esta tesis, han permitido mejorar esta ruta y obtener el ácido **15** con un rendimiento global del 44% y una duración total acumulada de 28 horas en cinco etapas.

Los compuestos **11** a **15** estaban descritos por el Prof. Nielsen, pero sus espectros no han sido asignados. En esta tesis se ha realizado dicha asignación mediante ^1H -RMN y ^{13}C -RMN por técnicas bidimensionales.

El ácido **15** es el producto de partida para la síntesis de la primera generación de ligandos (**1** - **4**) dado que los aminoazúcares y el ciclohexilo se acoplan directamente vía enlace amida. Además, este producto **15** también es precursor de los ligandos de la segunda generación con el espaciador de β -Alanina (**5** - **10**). El acoplamiento con la β -Alanina se lleva a cabo empleando de nuevo HBTU como agente de acoplamiento y DIPEA como base (Figura 5.11).

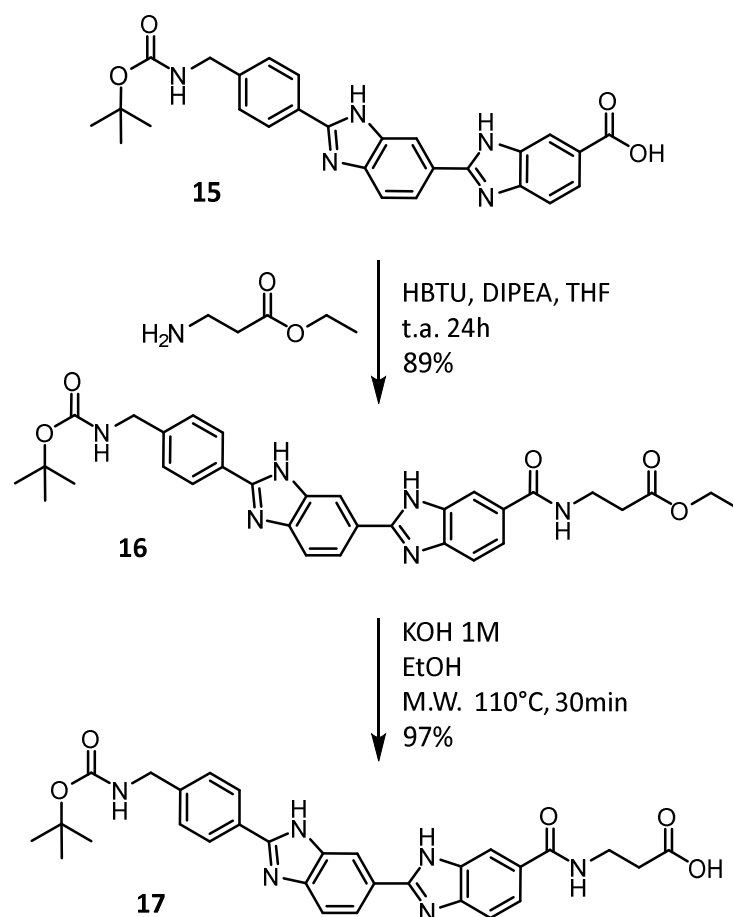


Figura 5.11 Reacción de acoplamiento con β -Alanina y desprotección del grupo carboxilo

En este caso se emplea THF como disolvente pues de este modo el producto deseado **16** precipita en el medio de reacción y puede purificarse directamente por filtración. Tras el acoplamiento, se realiza la hidrólisis del éster empleando de nuevo KOH y calefacción por microondas para obtener el ácido **17**, de nuevo puro por precipitación. El ácido derivado de bis(benzimidazol)- β -Ala es el precursor de los ligandos glicosilados (**5** - **10**) y se ha obtenido con un rendimiento global del 38% en siete etapas. Cabe destacar que en su síntesis no ha sido necesaria ninguna purificación por columna cromatográfica, obteniéndose en todas las etapas el producto deseado puro por precipitación.

5.3. Síntesis de glicosilaminas (19a-e)

Para la preparación de los aminoazúcares se ha seguido una metodología empleada previamente en el grupo de investigación⁸⁶ partiendo en este caso de los azúcares libres D-Glucosa, D-Manosa, L-Glucosa, L-Manosa y D-Manosa uniformemente marcada con ^{13}C (D-Manosa- $^{13}\text{C}_6$). En primer lugar, se realiza la protección de los grupos hidroxilo del

carbohidrato con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente, dando lugar a los correspondientes azúcares peracetilados **18a - e** (Figura 5.12) con rendimientos superiores al 92%. La proporción de la mezcla de anómeros se determina mediante ^1H -RMN a través de los protones anoméricos de cada carbohidrato. Los anómeros no se aíslan y se continua la síntesis con los carbohidratos como mezcla de anómeros. En la siguiente etapa, los azúcares protegidos se tratan con trimetilsilil azida y tetracloruro de estaño para formar los derivados con un grupo azida en la posición anomérica (**19a - e**) con rendimientos superiores al 87%.

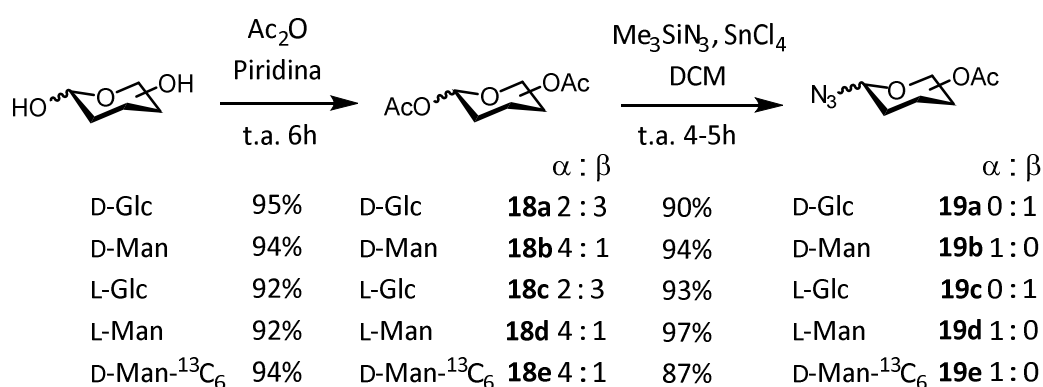


Figura 5.12 Síntesis de glicosilazidas **19a - e**

La estereoselectividad obtenida en la síntesis de las glicosilazidas se debe al ion aciloxonio formado en la reacción por asistencia anquimérica del grupo acetato cuando el carbohidrato tiene una configuración 1,2-*trans*,⁸⁷ obteniéndose como resultado una configuración β (Figura 5.13). Cuando el carbohidrato tiene una configuración 1,2-*cis*, sucede algo parecido mediante una anomerización causada por el ácido de Lewis,⁸⁸ obteniéndose en este caso una configuración α .

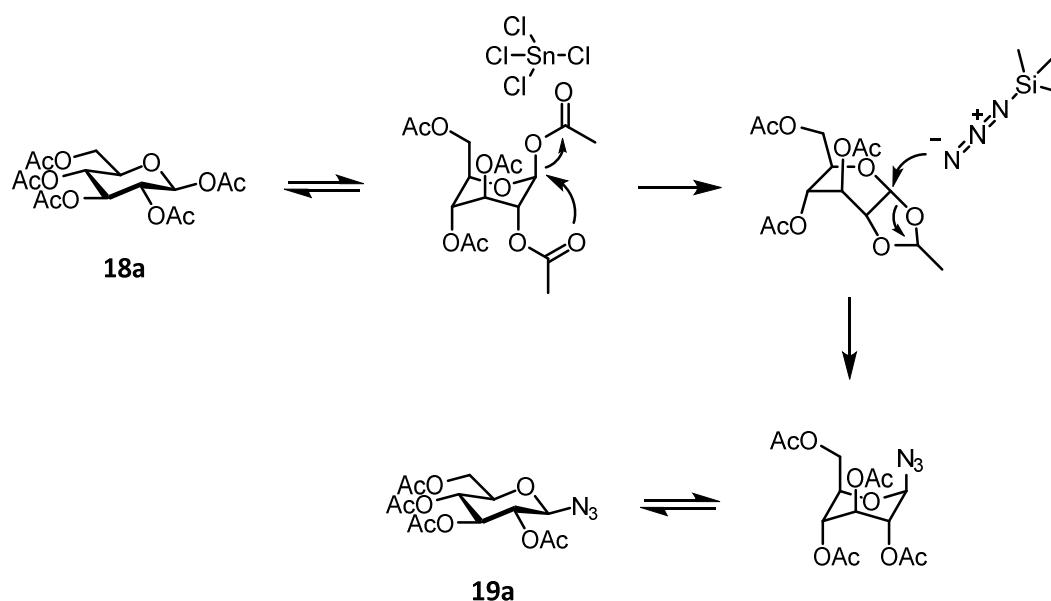


Figura 5.13 Mecanismo para la formación de β -D-Glucosazida⁸⁷

La configuración de los protones anoméricos de los derivados **19a** - **e** pudo comprobarse por RMN, mediante el análisis de la constante de acoplamiento J^3_{H1-H2} y la observación de ciertos nOes. En el caso de la D y L-Glucosa, el valor de la constante de acoplamiento entre H1 y H2 es de 8.8 Hz, correspondiente a una posición diaxial, por lo que el carbohidrato se encuentra en una configuración β . Para la D y L-Manosa, esta constante de acoplamiento entre H1 y H2 es de 1.9 Hz, correspondiente a una posición diecuatorial, por lo que el carbohidrato se encuentra en una configuración α . Además, se han observado nOes entre los protones H1, H3 y H5 en Glucosa y entre H1 y H2 en Manosa, lo que confirma su configuración (Figura 5.14).

(AcO)₄- β -D-Glucosa-N₃ (**19a**)

(AcO)₄- β -D-Manosa-N₃ (**19b**)

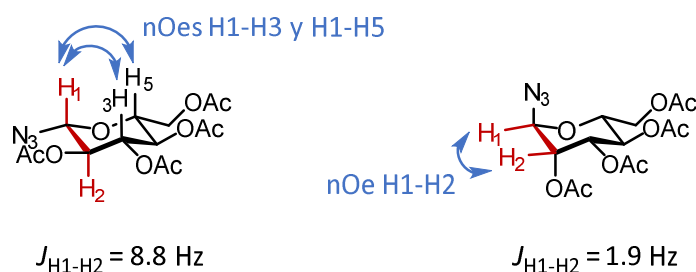


Figura 5.14 Estructura de la glicosilazidas **19a** y **19b** en CDCl₃

Por último, la etapa final de la síntesis de glicosilaminas consiste en la reducción del grupo azida anomérica de los derivados **19a - e** empleando como catalizador paladio sobre carbono bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente (Figura 5.15).

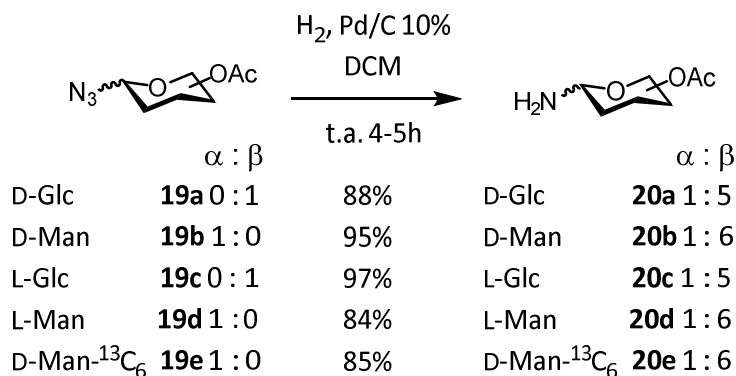


Figura 5.15 Reducción de glicosilazidas a glicosilaminas

Como resultado de esta reducción, el anómero mayoritario para las glicosilaminas sintetizadas es el β en todos los casos, según los nOes observados por RMN (Figura 5.16).

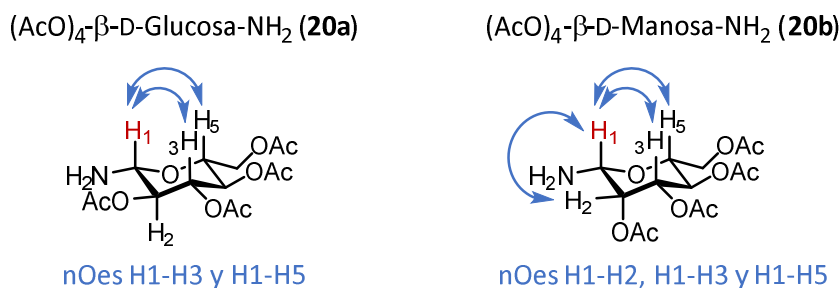


Figura 5.16 Estructura de la glicosilaminas **20a** y **20b** en CDCl₃

5.4. Formación del enlace amida vector (**15**, **17**) - carbohidrato (**20a - e**) y desprotecciones finales

Una vez sinterizados los vectores derivados de bis(benzimidazol) (**15**) y con espaciador de β -Alanina (**17**) y las glicosilaminas (**20a - e**), se lleva a cabo la formación del enlace amida entre ellos, dando lugar a los ligandos del surco menor protegidos de ambas familias (**21a - d** y **22a - f**). Este enlace se forma empleando HBTU como agente de acoplamiento y DIPEA como base (Figura 5.17). Este método también se ha empleado para obtener los derivados de ciclohexilo protegidos (**21d** y **22f**) a partir de ciclohexilamina comercial.

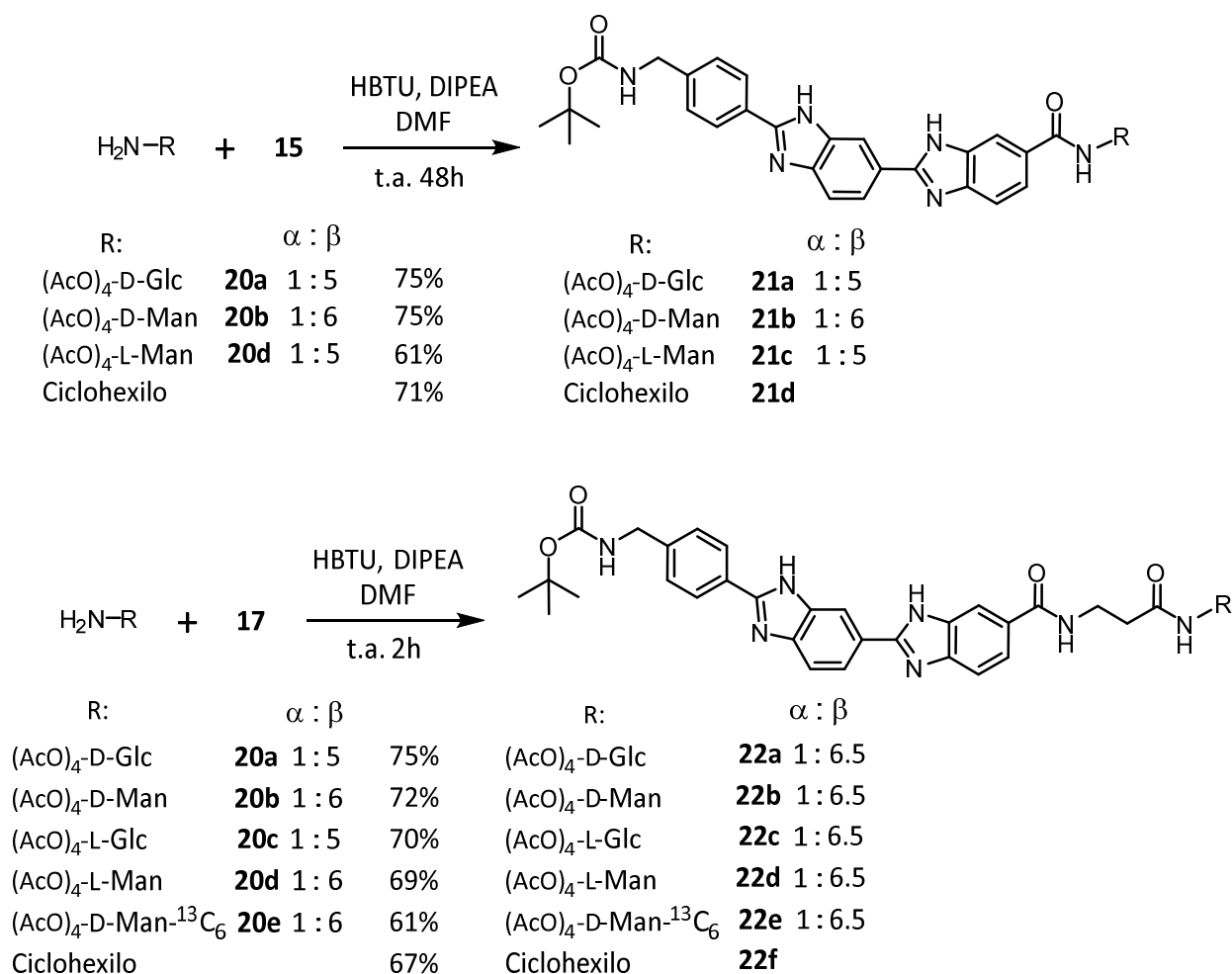


Figura 5.17 Acoplamiento entre los ácidos **15** y **17** con las glicosilaminas **20a - e** y ciclohexilamina

La duración de la reacción es de 48 horas para los derivados de la primera generación (**21a - d**) y de solamente 2 horas para los derivados de la segunda (**22a - f**). Esto es debido a la mayor estabilidad del grupo ácido activado del derivado **15**, haciéndolo menos reactivo que el ácido activado del derivado **17**. Como resultado de este acoplamiento, se obtienen los derivados **21a - d** y **22a - e** con un rendimiento en torno al 70% tras purificarlo por cromatografía en columna. En el caso de los derivados con carbohidratos, la proporción de anómeros α y β determinada por ¹H-RMN en el crudo de reacción es de 1:5 para los derivados de la primera generación y de 1:6.5 para los de la segunda. En esta etapa no ha sido posible la separación de los anómeros α y β para ninguno de los compuestos, pero sí pudo identificarse y asignarse el anómero mayoritario β por RMN a partir de la identificación de la resonancia del protón anomérico H1 en torno a 5.80 ppm.

La siguiente etapa consiste en la desprotección de los grupos hidroxilo del carbohidrato en medio básico empleando metóxido sódico en metanol (Figura 5.18).⁸⁹ Durante estas reacciones apareció una pequeña cantidad de un precipitado blanco, que, tras filtrarlo, se pudo comprobar que correspondía al producto deseado. Tras su análisis por ¹H-RMN, resultó que este precipitado se correspondía con el anómero β puro, examinando las resonancias de los protones anoméricos de cada derivado. Por tanto, se decidió realizar esta reacción empleando la menor cantidad posible de disolvente para todos los derivados y así favorecer la precipitación de este anómero. Como resultado, se logró aislar el anómero β deseado puro por precipitación directamente del medio de reacción tanto para los derivados de la primera generación **23a - c** como para los de la segunda **24a - e**. El rendimiento indicado en la Figura 5.18 corresponde a la obtención del anómero β con este método.

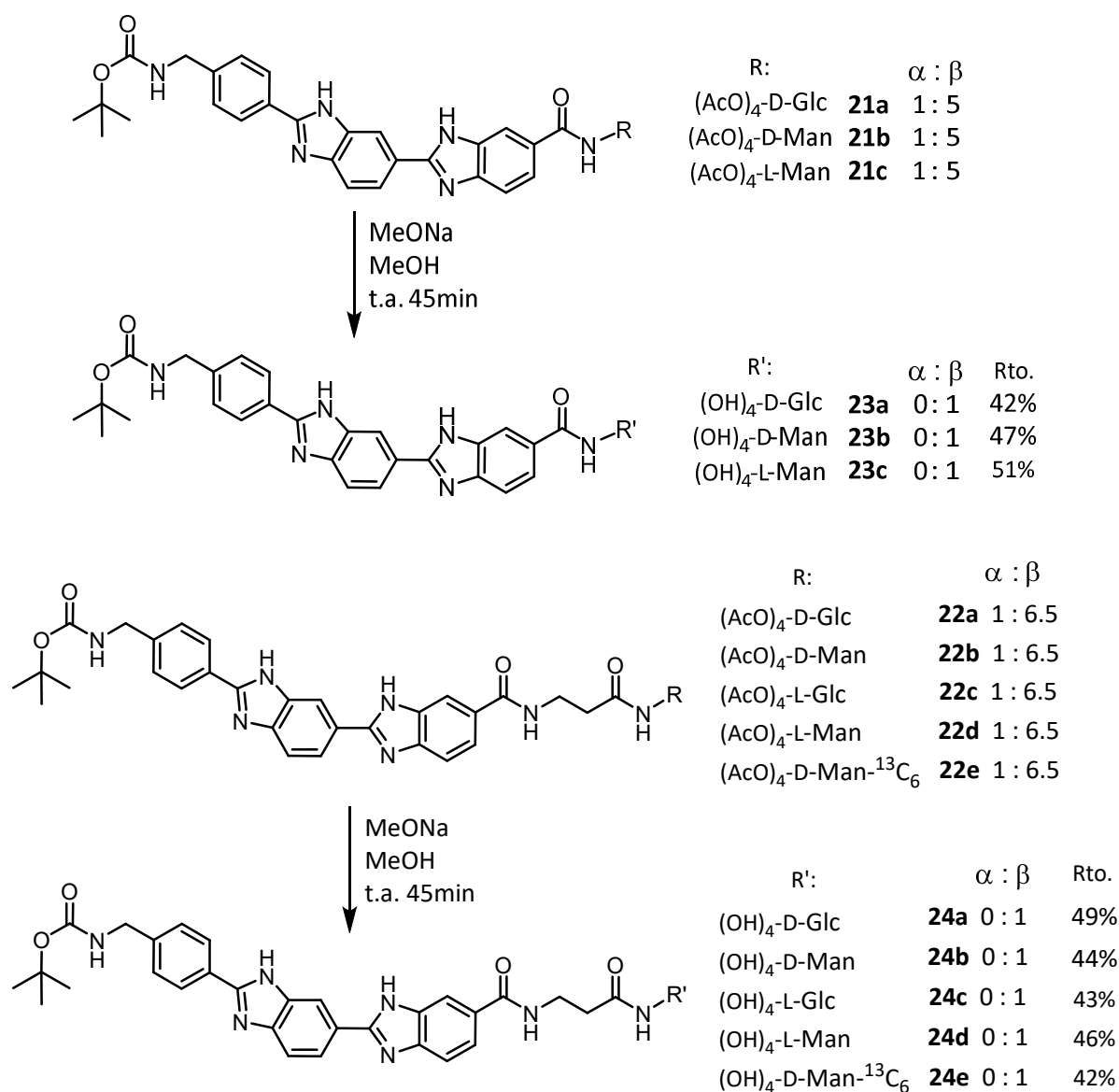


Figura 5.18 Desprotección de los grupos hidroxilo de los derivados **21a - c** y **22a - e**

La última etapa de la síntesis es la desprotección del grupo amino presente en la zona aromática del vector de bis(benzimidazol). La eliminación del grupo protector BOC se suele llevar a cabo en medio ácido, aunque hay que tener en cuenta que los azúcares son sensibles a este medio y pueden llegar a anomerizar. Por tanto, la reacción se realizó empleando ácido trifluoroacético en diclorometano en tiempos de reacción muy cortos para evitar la anomerización,⁹⁰ obteniendo así únicamente el anómero β de los productos finales **1** - **10** con un rendimiento cuantitativo tras la evaporación del disolvente (Figura 5.19).

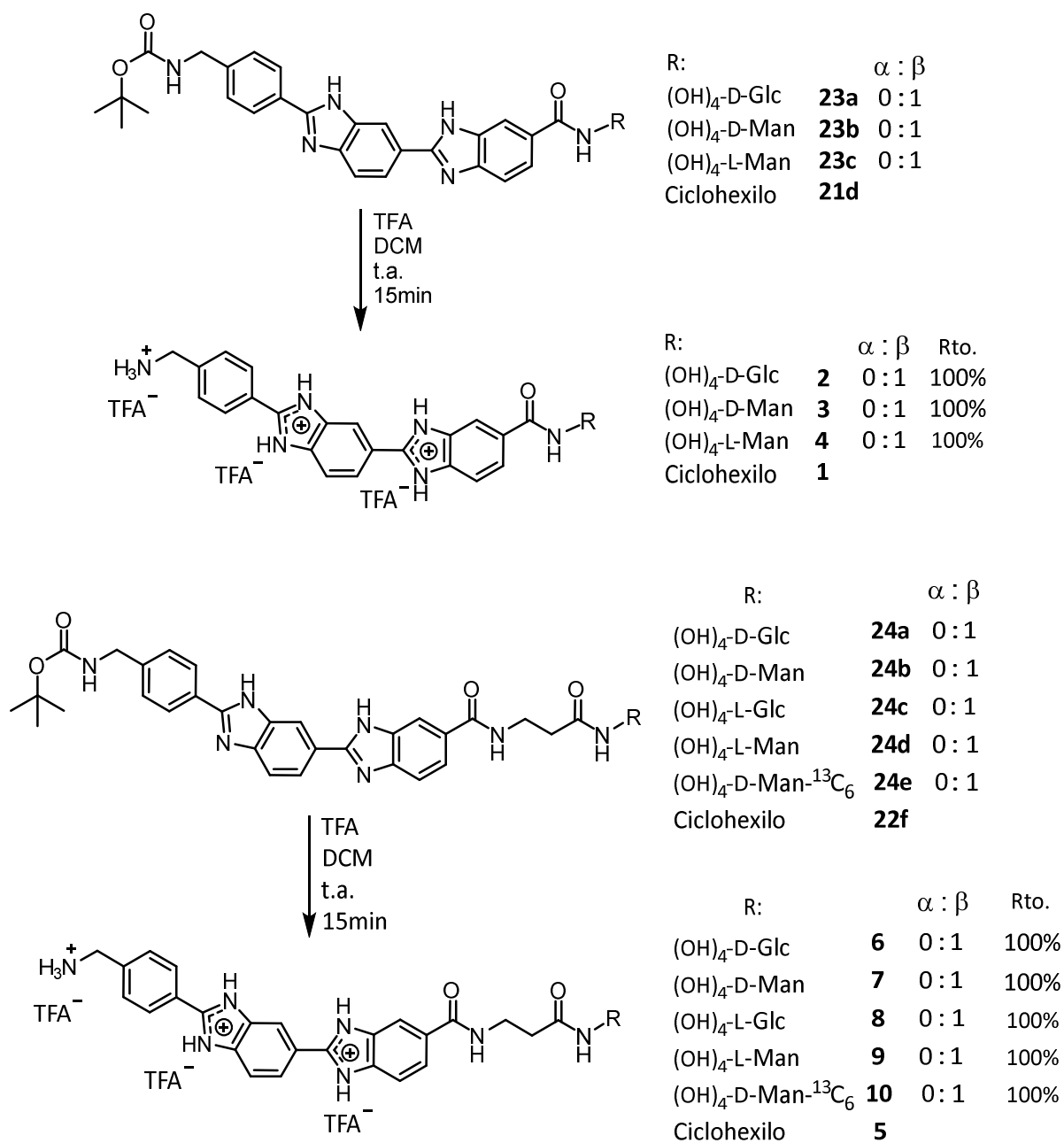


Figura 5.19 Desprotección del grupo amino de los derivados de bis(benzimidazol)

Como resultado de esta última etapa de desprotección, se han aislado los ligandos derivados del vector de bis(benzimidazol) **1 - 4** y los derivados de bis(benzimidazol) con espaciador de β -Alanina **5 - 10** con estereoquímica β en el enlace de amida anomérica. La configuración β de los derivados glicosilados (**1 - 4** y **6 - 10**) se pudo determinar por ^1H -RMN gracias a la observación de nOes entre el protón anomérico H1 y los protones H3 y H5 en todos los derivados glicosilados en $\text{DMSO-}d_6$. Además, el análisis de las constantes de acoplamiento H1 - H2 también indica la obtención de dicho anómero. Así, en los derivados de Manosa esta constante de acoplamiento tiene un valor en torno a 1.2 Hz y en derivados de Glucosa en torno a 9.1 Hz.

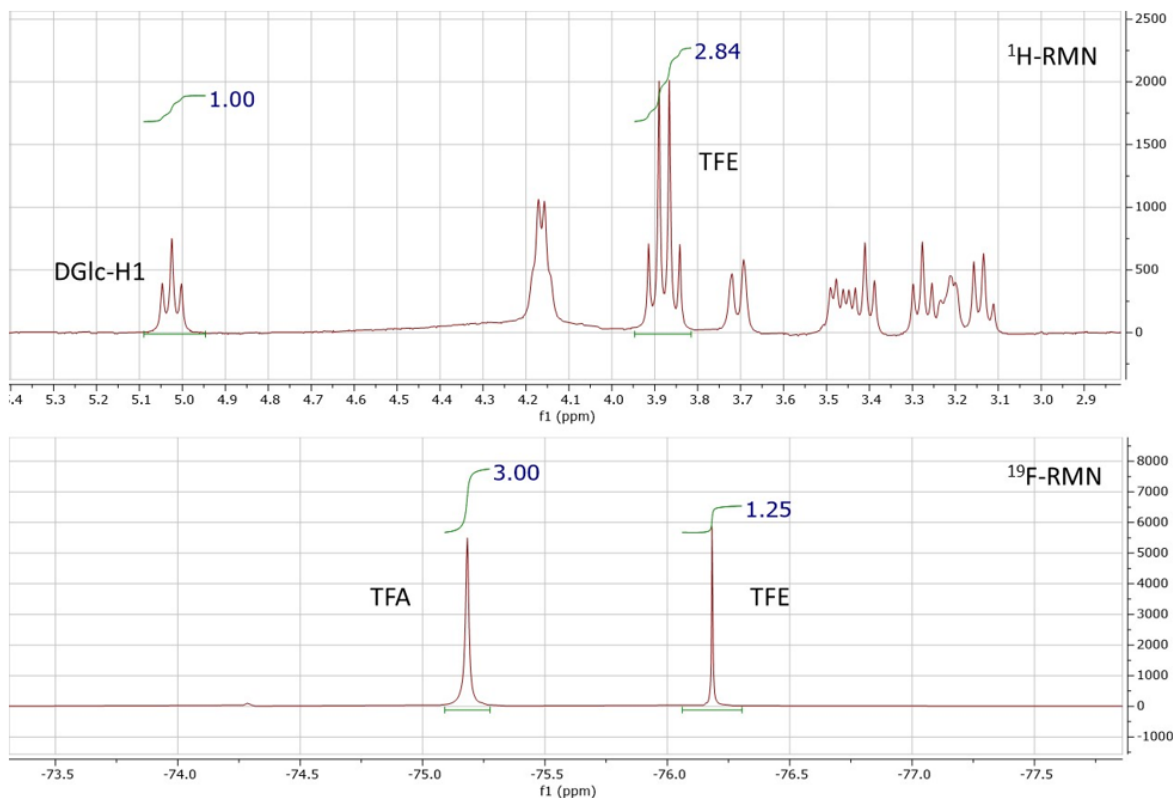
Todos los ligandos **1 - 10** han resultado ser solubles en agua, lo que ha permitido realizar todos los estudios de caracterización e interacción en medio fisiológico.

Como resultado de esta última etapa de desprotección, el compuesto final queda en forma de sal de amonio, con trifluoroacetato como contraión. Dado que en la molécula los dos benzimidazoles también tienen la capacidad de protonarse en estas condiciones de reacción, es posible que haya más de un ion trifluoroacetato formando la sal. Es muy importante determinar la composición de la sal formada para poder conocer la concentración exacta de ligando al preparar las muestras para los estudios de autoasociación e interacción. Para conseguir esto, pensamos en hacer uso de experimentos de ^{19}F -RMN.

El trifluoroacetato puede detectarse por ^{19}F -RMN y, en esta técnica, las resonancias de flúor son integrables, al igual que las de protón en ^1H -RMN. El inconveniente es que el ligando no contiene ningún átomo de flúor con el que comparar su integral. Para poder comparar la señal de ^{19}F -RMN del trifluoroacetato con la señal de ^1H -RMN del ligando, es necesario añadir un compuesto a modo de referencia que presente resonancias en ambas técnicas y no solapen con las resonancias del producto a analizar. El compuesto elegido en este caso ha sido el trifluoroetanol (TFE).

El TFE se añade en una concentración similar a la del ligando para poder comparar bien la integral de sus resonancias. En la Figura 5.20 se muestra como ejemplo el resultado obtenido con el ligando bis(benzimidazol)- β -D-Glc (**2**). La relación obtenida ligando / TFE en el espectro de ^1H -RMN es de 0.70 y la relación obtenida TFA / TFE en el espectro de ^{19}F -RMN es de 2.4, por lo tanto, la relación que se obtiene entre el TFA y el ligando es de 3.42. Es decir, hay aproximadamente 3 trifluoroacetatos como contraión

para cada molécula de ligando, lo que se corresponde con la protonación tanto del grupo amino como de los dos benzimidazoles de la molécula.



$$\frac{\text{Ligando}}{\text{TFA}} = \frac{1}{2.84/2} = 0.70$$

$$\frac{\text{TFA}}{\text{TFE}} = \frac{3}{1.25} = 2.4$$

$$\frac{\text{Ligando}}{\text{TFA}} = \frac{2.4}{0.70} = 3.42$$

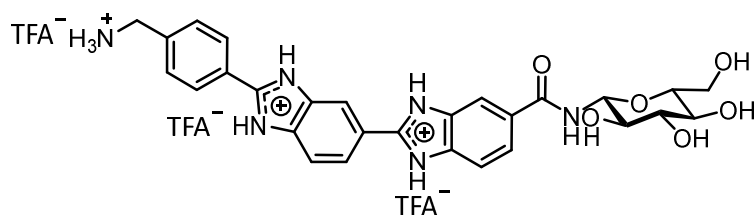


Figura 5.20 Espectros de ^1H -RMN y ^{19}F -RMN del derivado bis(benzimidazol)- β -D-Glc (**2**) con TFE en $\text{DMSO}-d_6$ y relación entre la integral de sus resonancias

Una vez que los ligandos se llevan a pH fisiológico empleando una disolución reguladora, los dos benzimidazoles quedan desprotonados, según estudios realizados con el Hoechst 33258,⁹¹ quedando en nuestro caso únicamente el grupo amino protonado.

5.5. Conclusiones

Se ha optimizado una ruta sintética para la obtención de derivados glicosilados de bis(benzimidazol). Además, varias de las etapas de síntesis se logran en tiempos muy cortos y logrando precipitar el producto deseado en el medio de reacción, lo que evita purificaciones adicionales que puedan disminuir el rendimiento.

Se han sintetizado un total de diez ligandos del surco menor del ADN derivados de bis(benzimidazol). Cuatro de estos ligandos contienen el vector derivado de bis(benzimidazol) con el carbohidrato o el ciclohexilo directamente unido a la parte aromática del vector (**1** - **4**). La estereoquímica en el enlace anomérico es β , tal como requería el diseño de estos ligandos.

Los ligandos **5** - **10** contienen en su estructura el vector de bis(benzimidazol) con un espaciador de β -Alanina. En ellos también se ha logrado obtener la estereoquímica β en el carbohidrato. El ligando **10** se trata de un derivado de D-Manosa que contiene el carbohidrato uniformemente marcado con ^{13}C , sintetizado para los estudios de interacción con ADN por RMN.

La parte del vector de bis(benzimidazol) común a todos los ligandos, se ha sintetizado siguiendo el esquema sintético propuesto por el Prof. Nielsen y el Prof. Jacobsen y los compuestos **11** - **15** estaban descritos en sus trabajos.⁵⁹ Sin embargo, las etapas sintéticas se han optimizado en esta tesis, de manera que el ácido **15** se ha obtenido con un rendimiento global del 44%. De esta manera, se ha logrado obtener los ligandos **1** - **4** en 8 etapas con un rendimiento global en torno al 14% y los ligandos **5** - **10** en 10 etapas con un rendimiento global en torno al 12%.

Hay que destacar que hasta la obtención del compuesto **17** no es necesaria ninguna purificación por columna cromatográfica, obteniendo todos los productos **11** - **17** puros por precipitación.

Se ha podido aislar anómero β puro de los ligandos glicosilados de ambas familias en la etapa previa a la desprotección final (**23a** - **a** y **24a** - **e**) por precipitación en el mismo medio de reacción.

Por último, en los ligandos desprotegidos **1** - **10** se ha podido determinar la cantidad de contraiones trifluoroacetato presentes al formar la sal del derivado en la última etapa de desprotección mediante ^1H -RMN y ^{19}F -RMN. Esto ha sido fundamental para poder calcular correctamente sus concentraciones, de cara al estudio de sus propiedades en medio acuoso tanto en su forma libre como asociados al ADN.

Capítulo 6

CONCLUSIONES GENERALES

La conclusión más importante de esta tesis es que se ha logrado un diseño eficaz de un vector capaz de llevar carbohidratos hasta el interior del surco menor del ADN. Gracias a esto, se ha podido cuantificar la contribución de los distintos carbohidratos a la interacción con el surco menor del ADN por CD, así como determinar el sitio de interacción del carbohidrato dentro del surco menor por RMN.

Se han optimizado las etapas sintéticas descritas para la obtención del vector de bis(benzimidazol) (**15**) pasando de un rendimiento global del 23%, a un rendimiento global del 44% en cinco etapas. Además, en la ruta sintética que conduce a la formación del vector **15** y del vector con espaciador de β -Alanina **17**, todos los productos se obtienen puros por precipitación, sin necesidad de purificaciones adicionales.

Se han sintetizado un total de diez nuevos ligandos del ADN glicosilados derivados de bis(benzimidazol) divididos en dos familias: en la primera el carbohidrato está unido directamente al vector de bis(benzimidazol) por un enlace amida (**1** - **4**) y la segunda cuenta con un espaciador de β -Alanina entre vector y carbohidrato (**5** - **10**).

La primera familia está formada por los ligandos: bis(benzimidazol)-Ciclohexilo (**1**), bis(benzimidazol)- β -D-Glucosa (**2**), bis(benzimidazol)- β -D-Manosa (**3**) y bis(benzimidazol)- β -L-Manosa (**4**).

La segunda familia está formada por los ligandos: bis(benzimidazol)- β -Ala-Ciclohexilo (**5**), bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glucosa (**6**), bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa (**7**), bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Glucosa (**8**), bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Manosa (**9**) y un derivado con un carbohidrato uniformemente marcado con ^{13}C : bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa- $^{13}\text{C}_6$ (**10**).

La estereoquímica en el enlace anomérico es β en todos los ligandos glicosilados preparados, tal como requería el diseño de estos compuestos.

El estudio de la primera familia de derivados (**1** - **4**) en medio fisiológico ha permitido caracterizar el proceso de autoasociación que muestran mediante diversas técnicas (CD, RMN, ITC), determinando que dicho proceso es isodésmico. Además, se pudo comprobar por ITC que la cinética de agregación es rápida, pudiendo emplear esta técnica en un futuro para caracterizar termodinámicamente las propiedades del estado libre y de interacción con el ADN de este tipo de ligandos.

Esta primera generación de ligandos (**1 - 4**), interacciona con el surco menor del ADN con elevadas constantes de afinidad, con selectividad de secuencia hacia pares de bases AT y forma complejos 1:1 con los oligonucleótidos estudiados (A_2T_2 y A_3T_3). Sin embargo, no logró acercar los carbohidratos hasta el interior del surco menor, según los estudios realizados por CD y RMN (STD).

Para superar este inconveniente, se diseñó una segunda generación de ligandos (**5 - 10**) que cuenta con un espaciador de β -Alanina entre el vector de bis(benzimidazol) y el carbohidrato, otorgándole libertad de movimiento. Con este nuevo diseño, se pudo comprobar por CD y RMN (STD) cómo el carbohidrato lograba introducirse en el interior del surco menor del ADN. De esta forma fue posible que el carbohidrato estableciera su interacción con las bases del ADN y, por tanto, fue factible un estudio comparativo de su interacción.

De este modo, por primera vez en el grupo de investigación, se ha logrado calcular la contribución del carbohidrato a la interacción con el surco menor del ADN. Este aporte ha resultado ser bastante elevado, llegando a alcanzar -2.1 Kcal/mol en el caso del derivado de β -L-Glucosa (**8**) con el oligonucleótido A_3T_3 .

Adicionalmente, se ha podido evaluar la influencia de la quiralidad en el proceso de interacción con el ADN, encontrándose que, en todos los casos, los complejos formados con derivados de azúcares de la serie L (**8 y 9**) son más estables que los formados con derivados de la serie D (**6 y 7**).

Para complementar los datos energéticos, se ha llevado a cabo el estudio estructural en disolución acuosa del complejo formado por el oligonucleótido A_2T_2 con el ligando bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Manosa (**9**) y con el ligando con carbohidrato uniformemente marcado con ^{13}C bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa- $^{13}C_6$ (**10**). Se trata de dos ligandos enantiómeros y por tanto la información estructural obtenida corresponde a dos complejos diastereoméricos.

En dichos complejos, se ha logrado obtener información estructural acerca de la ubicación en el complejo de la parte aromática del vector, pudiendo determinar su posición en las bases centrales AATT del oligonucleótido a través de desplazamientos químicos inducidos y de la observación de nOes oligonucleótido - vector. El vector se sitúa de forma idéntica en ambos complejos, por lo que podemos afirmar que las

diferencias observadas en las constantes de afinidad por CD se deben exclusivamente a interacciones específicas de los carbohidratos.

Haciendo uso del ligando marcado con ^{13}C , se ha logrado poner a punto una metodología empleando experimentos novedosos de RMN (3D NOESY-HSQC y ^1H , ^{13}C -HSQC-NOESY) y aplicarlos a la determinación estructural de la interacción carbohidrato - ADN.

Mediante estos experimentos ha sido posible la detección del carbohidrato β -D-Manosa en el complejo con A_2T_2 , determinando las bases con las que establece su interacción. El derivado de β -D-Manosa (**10**) está orientado con sus centros 1 y 2 (involucrados en la cooperatividad de enlace de hidrógeno) hacia el interior del suco menor y que está próximo espacialmente a la Adenina A5-A (que cuenta con aceptores de enlace de hidrógeno).

Teniendo en cuenta esta información estructural y los datos obtenidos por CD en la comparación entre los derivados de β -D-Glucosa (**6**) y β -D-Manosa (**7**), es muy posible que la contribución extra de 0.3 Kcal/mol a la estabilización del complejo con A_2T_2 en favor de la Manosa sea debida a la cooperatividad de enlace de hidrógeno.

Las características singulares y propiedades de interacción del nuevo vector de bis(benzimidazol) con espaciador de β -Alanina presentadas en esta tesis doctoral, abre la vía al estudio detallado de los parámetros termodinámicos de la interacción carbohidrato-ADN y de nuevos diseños de carbohidratos con redes de enlace de hidrógeno cooperativas para la obtención de azúcares selectivos de secuencias específicas de ADN.

PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Experimentos de autoasociación por UV y CD

Los espectros de absorción UV y dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-815, capaz de registrar simultáneamente los espectros de UV y de CD. Se han empleado cubetas de cuarzo con un paso óptico de 10 mm tratadas en su interior con el producto comercial SigmaCote®. El intervalo de longitud de onda estudiada está comprendido entre 220 y 450 nm con una anchura de rendija de 1 nm.

El disolvente empleado fue una disolución reguladora de MOPS 25 mM ajustando su a pH = 7.05 empleando una disolución acuosa de NaOH 1M. Esta disolución se empleó como blanco en todos los casos. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 20 °C. Para las medidas de pH se empleó un pH-metro Crimson Basic-20 equipado con un electrodo de vidrio Crimson 5029.

7.1.1. Metodología general para la realización de experimentos de dilución por UV y CD

El método para calcular los coeficientes de extinción molar de los ligandos consiste en medir la absorbancia de distintas disoluciones de ligando a concentraciones conocidas preparadas a partir de una disolución madre. A partir de la ley de Lambert-Beer, representando la absorbancia en cada punto frente a la concentración, se obtiene una recta cuya pendiente es el coeficiente de extinción molar.

Para ello, se disuelven 0.5 mg de cada ligando (**1** - **10**) en 1 ml de disolución reguladora, obteniendo así la disolución madre de concentración conocida. La concentración se calcula empleando el peso molecular de la sal con tres trifluoroacetatos como contraiones. A partir de ella, se prepararon doce disoluciones más diluidas de concentraciones comprendidas entre 100 - 3 μ M, registrando un espectro de UV y de CD de cada una de ellas.

Para el cálculo del coeficiente de extinción molar, se representó la absorbancia al máximo de absorción del ligando ($\lambda = 336$ nm) frente su concentración, obteniéndose una recta cuya pendiente es el coeficiente de extinción molar (ver figuras 2.5 y 3.3).

7.1.2. Metodología general para la realización de experimentos de temperatura variable por CD

Se realizaron dos tipos de experimentos de CD a temperatura variable con el ligando bis(benzimidazol)- β -D-Glc (**2**).

- En el primer método se preparó una disolución 70 μ M del ligando **2** en disolución reguladora y se midió su espectro de CD entre 220 y 450 nm a varias temperaturas fijas: entre 278 y 358 K a intervalos de 10 K (ver Figura 2.8).
- En el segundo método se prepararon disoluciones a varias concentraciones del ligando **2**. Se seleccionó la longitud de onda del mínimo de CD de la banda negativa del espectro del ligando (350 nm) y se midió su intensidad de CD al variar la temperatura entre 358 y 278 K a intervalos de 1 K (ver Figura 2.9).

7.2. Metodología general para la realización de experimentos de autoasociación por RMN (^1H -RMN y DOSY)

Estos experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AV 500MHz en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Para la preparación de las muestras se utilizó una disolución reguladora de imidazol- d_4 25 mM a pH = 7.03 preparada con D_2O . Como referencia externa se empleó TSP- d_4 a una concentración de 20 μ M. Para acidificar las muestras se empleó una disolución de DCl 1M en D_2O . Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 25 °C.

Para la adquisición del experimento DOSY se empleó una secuencia de pulsos con gradiente bipolar (ledbpgp2s), con una duración del gradiente de $\delta = 1500 \mu\text{s}$ y un tiempo de difusión de $\Delta = 0.12 \text{ s}$. El gradiente fue del 95 al 5% de atenuación de señal en 32 puntos.

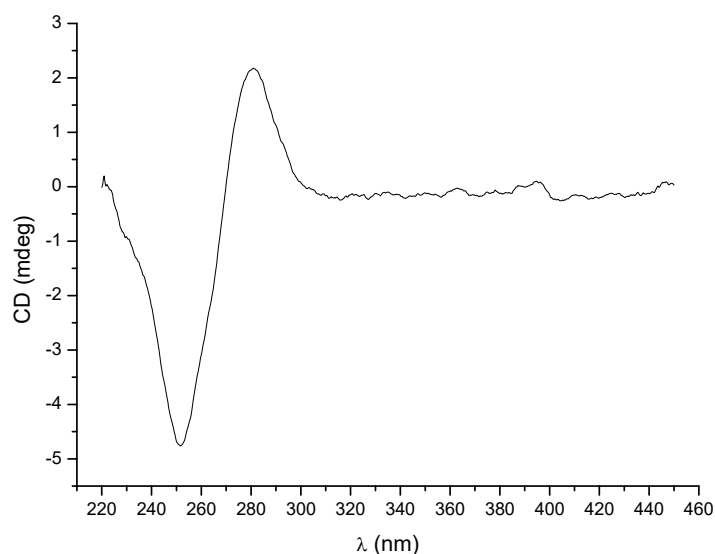
Para la realización del experimento a distintos pH, se prepararon 0.5 ml de una disolución de ligando 500 μ M en un tubo de RMN de 5 mm. Se registró un espectro de ^1H -RMN a pH = 7.03 seguido de un DOSY. Se fueron añadiendo pequeñas cantidades de una disolución de DCl 1M (5 μl), registrando un espectro de ^1H -RMN y un DOSY tras cada adición (ver figuras 2.10 y 2.11).

Para medir el pH tras cada adición de DCl, se empleó un pH-metro Crimson Basic-20 equipado con un electrodo de vidrio Crimson 5029.

7.3. Experimentos de interacción por CD con oligonucleótidos de ADN

Los espectros de absorción UV y dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-815. Se han empleado cubetas de cuarzo con un paso óptico de 10 mm tratadas en su interior con SigmaCote®. El intervalo de longitud de onda estudiada está comprendido entre 220 y 450 nm con una anchura de rendija de 1 nm. Los experimentos se realizaron a una temperatura de 20 °C. El disolvente empleado fue una disolución reguladora de MOPS 25 mM y NaCl 200 mM a pH = 7.05. Esta disolución se empleó como blanco en todos los casos. Las muestras de oligonucleótidos fueron adquiridas en SigmaAldrich desalados y en escala de 1 mg.

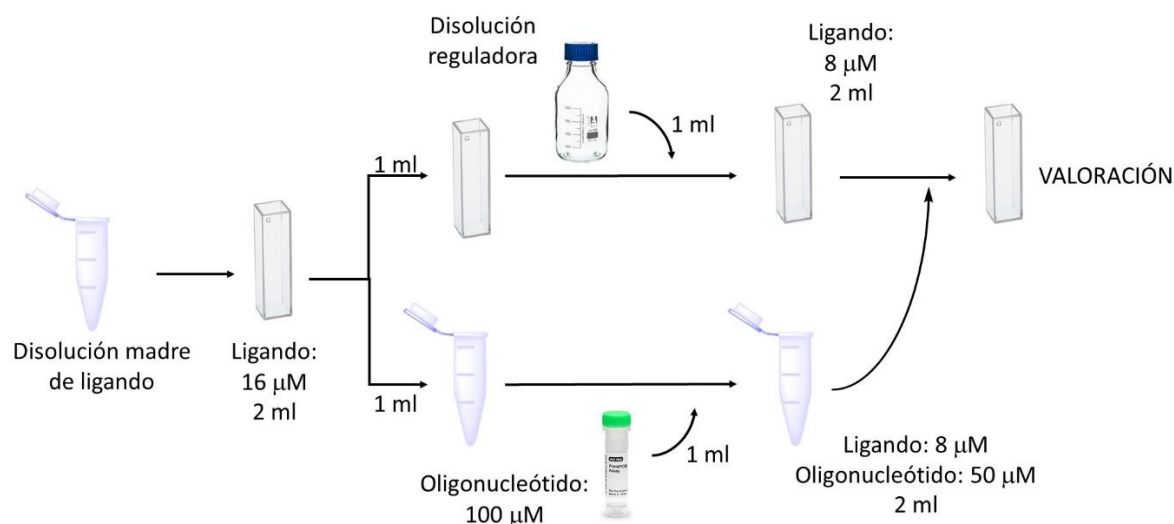
Como paso previo a los experimentos con oligonucleótidos, es necesario generar la estructura de B-ADN en los oligonucleótidos. El método general para su renaturalización consiste primero en centrifugar la muestra durante 5 min a 5000 rpm. Posteriormente, se disuelve en la cantidad necesaria de disolución reguladora para lograr una concentración de 100 μ M y se calienta en un baño de agua a 95 °C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se deja que la disolución alcance la temperatura ambiente lentamente. Para confirmar que el oligonucleótido está en la forma B-ADN se realiza un espectro de CD. La forma B-ADN tiene un mínimo en torno a 250 nm y un máximo en torno a 280 nm.⁹²



Para el cálculo de la concentración de los oligonucleótidos se emplearon sus coeficientes de extinción molar (para su forma de dímeros como doble hélice): para A₂T₂ $\epsilon_{258} = 193070 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$,⁶⁸ para (A₃T₃) $\epsilon_{258} = 187077 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁶⁸ y para R13 $\epsilon_{260} = 231570 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁵⁸

7.3.1. Metodología general para la realización de valoraciones a concentración constante de ligando por CD

Se disuelven 0.1 mg de ligando en 1 ml de disolución reguladora. Esta disolución se filtra con un filtro de acetato de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro y se almacena en un Eppendorf. A partir de esta disolución madre, se preparan 2 ml de una disolución de ligando en torno a 16 μM , comprobando su concentración por UV. Esta disolución se separa en dos porciones de 1 ml. A una de las porciones se le añade 1 ml de disolución reguladora y se registra un espectro de CD, convirtiéndose en el punto inicial de la valoración. A la otra porción, se le añade 1 ml de disolución de oligonucleótido, quedando de esta forma la misma concentración de ligando en ambas disoluciones. Para la realización de la valoración, se añaden cantidades crecientes de esta disolución de ligando y oligonucleótido a la disolución que contiene únicamente ligando, registrando un espectro de CD tras cada adición.



La representación de las isotermas de unión se realiza siguiendo la intensidad del máximo de CD del complejo a 343 nm en función de la concentración total de oligonucleótido en cada punto.

Alguna de las valoraciones se repitió con el objetivo de verificar su reproducibilidad y se comprobó que efectivamente, los resultados obtenidos para las valoraciones con los mismos ligandos y oligonucleótidos apenas variaban.

7.3.2. Metodología general para la determinación de la estequiometría de los complejos (Job Plots)

Se preparan dos disoluciones madre de ligando y de oligonucleótido 12 μM en la disolución reguladora. A partir de ellas, se preparan una serie de muestras con mezcla de ligando / oligonucleótido de forma que la suma de sus concentraciones sea siempre la misma, pero variando sus fracciones molares desde el 0% de oligonucleótido y 100% de ligando hasta 100% de oligonucleótido y 0% de ligando. Se registra un espectro de CD de cada una de las mezclas preparadas.

Para determinar la estequiometría del complejo se representa la intensidad del máximo de CD del complejo a 343 nm en función de la fracción molar de ligando. El máximo de esta representación indica la relación molar ligando / oligonucleótido en el complejo.

7.4. Metodología general para la realización de experimentos de interacción con *ct*-DNA por RMN: STD

Estos experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AV 600MHz en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Para la preparación de las muestras se empleó una disolución reguladora de imidazol- d_4 25 mM a pH = 7.1 preparada con D_2O . Como referencia externa se empleó TSP- d_4 a una concentración de 20 μM . Estos experimentos se realizaron a la temperatura de 37 °C.

Para estos experimentos se empleó una secuencia *stdiffesgp*. La irradiación *off-resonance* se hizo a $\delta = 50$ ppm. Las irradiaciones *on-resonance* se realizaron a $\delta = 4.5$ (protones H4', H5' y H5'' de las desoxirribosas) y 5.6 ppm (protón H1' de las desoxirribosas). El tiempo de saturación fue de 2 s y el tiempo de espera de 4 s. Los experimentos se realizaron con un total de 1024 scans.

La preparación de la muestra de ADN, se realizó disolviendo 30.3 mg de *ct*-DNA en 5 ml de disolución reguladora. Su concentración se midió por UV empleando para ellos su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{258} = 13200 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ por par de bases.⁹³

Para el blanco de STD, se preparó una disolución de ligando 100 μM en la disolución reguladora y se lanzó el experimento STD en las condiciones mencionadas anteriormente. Los experimentos en presencia de *ct*-DNA, se realizaron añadiendo sobre el blanco una alícuota de la disolución madre de *ct*-DNA, de forma que su concentración final fuese de 13 μM . El cálculo del porcentaje de STD, se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\% STD = 100 \frac{I_{off} - I_{on}}{I_{off}}$$

Donde I_{off} es la intensidad de señal del espectro *off-resonance* y I_{on} es la intensidad de señal del espectro *on-resonance*. El porcentaje real de STD de las muestras con *ct*-DNA se obtuvo tras restar el porcentaje de STD del blanco al porcentaje de STD obtenido con estas muestras.

7.5. Procedimiento general para la formación y caracterización de complejos ligando - oligonucleótido por RMN

Estos experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AV 600MHz en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Para la preparación de las muestras se utilizó una disolución reguladora de imidazol-*d*₄ 25 mM a pH = 7.1 preparada con D₂O y una concentración de NaCl de 100 mM a 25 °C. Como referencia externa se empleó TSP-*d*₄ a una concentración de 100 μM .

Como paso previo a los experimentos, es necesario diluir el oligonucleótido en D₂O y liofilizarlo hasta un total de 5 veces para intercambiar todos los protones intercambiables por deuterio. El paso siguiente es generar la estructura de B-ADN en los oligonucleótidos. El método general para su renaturalización consiste primero en centrifugar la muestra durante 5 min a 5000 rpm. Posteriormente se disuelve en la cantidad necesaria de disolución reguladora para lograr una concentración de 1000 μM y se calienta en un baño de agua a 95 °C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se deja que la disolución alcance la temperatura ambiente lentamente. Para confirmar que el

oligonucleótido está en la forma B-ADN se realiza un espectro de CD. La forma B-ADN tiene un mínimo en torno a 250 nm y un máximo en torno a 280 nm.⁹²

Para generar los complejos, se disuelven 0.2 mg de los ligandos **9** o **10** en 200 μ l de la disolución de oligonucleótido preparada anteriormente, quedando tanto el ligando como el oligonucleótido a una concentración de 1000 μ M, es decir, en proporción 1:1. La mezcla se agita y se deja reposar durante 24 horas antes de realizar los experimentos de RMN para dar tiempo a que se forme todo el complejo.

Para la caracterización de los complejos se realizaron experimentos de ^1H -RMN con 32 scans. Los experimentos TOCSY se realizaron con una secuencia dipsi2ph empleando unos tiempos de mezcla de 35 y 70 ms con un total de 24 scans. Los experimentos NOESY se realizaron empleando una secuencia noesygp3h con unos tiempos de mezcla de 100, 200 y 300 ms y un total de 32 scans.

En el caso del complejo con el ligando marcado con ^{13}C , se realizó un experimento HSQC editado empleando una secuencia hsqcetgp. Para el experimento 3D NOESY-HSQC se empleó la secuencia noesyhsqcetgp3d con un tiempo de mezcla de 200 ms y 8 scans. Por último, para el experimento ^1H , ^{13}C -HSQC-NOESY la secuencia empleada fue hsqcetgpnos3d con unos tiempos de mezcla de 100, 200 y 300 ms y 32 scans.

7.6. Síntesis de los ligandos derivados de bis(benzimidazol) (1 - 4) y bis(benzimidazol)- β -Ala (5 - 10)

7.6.1. Procedimientos generales

Todos los reactivos y productos de partida fueron adquiridos en distintas casas comerciales y fueron usados sin purificación adicional. Los disolventes fueron destilados según los procedimientos estándar para ello. La Amberlite® IR120 fue adquirida en Sigma-Aldrich.

Las reacciones se siguieron por cromatografía en capa fina usando cromatofolios de gel de sílice con soporte de aluminio (Merck Millipore 60 F254) con la mezcla de disolventes indicada en cada caso. Para su análisis se empleó luz UV y/o revelado (KMnO_4 o ninhidrina).

Para las purificaciones por cromatografía en columna se utilizó gel de sílice Merk (40-63 μm , 60 Å de tamaño de poro) empleando la mezcla de disolventes indicada en cada caso.

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrómetros Varian Inova-300, Varian Inova-400, Mercury-400 y Bruker AVANCE 500 en los disolventes indicados. Los desplazamientos químicos se indican en ppm tomando como referencia interna la señal de disolvente: $\text{CD}_3\text{SOCHD}_2$ (2.50 ppm) y CHCl_3 (7.26 ppm) para ^1H y CD_3SOCD_3 (39.52) y CDCl_3 (77.16) para ^{13}C . Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz). La multiplicidad se indica mediante las siguientes abreviaturas: s (singlete), sa (singlete ancho), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), dd (doblete doblete) ddd (doblete doble doblete), td (triple doblete), m (multiplete).

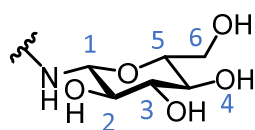
Los espectros de masas de baja resolución se registraron en un espectrómetro de masas Agilent Technology HP LC-MS serie 1100 mediante ionización por electrospray en modo positivo (ESI+). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro de masas Agilent 6520-Accurate Mass LC-MS Q-TOF. Los datos se expresan como masa entre carga (m/z).

Los espectros de IR se han realizado en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum One FTIR en pastilla de KBr.

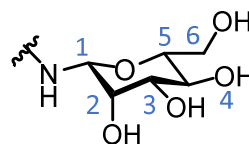
La rotación óptica se midió en un polarímetro Jasco P-2000, con lámpara de Na ($\lambda = 589 \text{ nm}$) en una cubeta de 10 cm de paso óptico a 25 °C, en los disolventes detallados en cada caso.

Las reacciones en reactor de microondas se realizaron en un equipo Discover-S de CEM Corporation en las condiciones especificadas en cada caso.

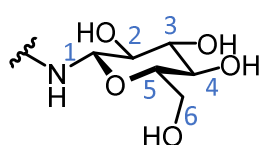
La nomenclatura y numeración empleada en la asignación de los derivados presentes en esta tesis es la siguiente:



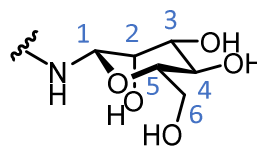
NH- β -D-Glucosa



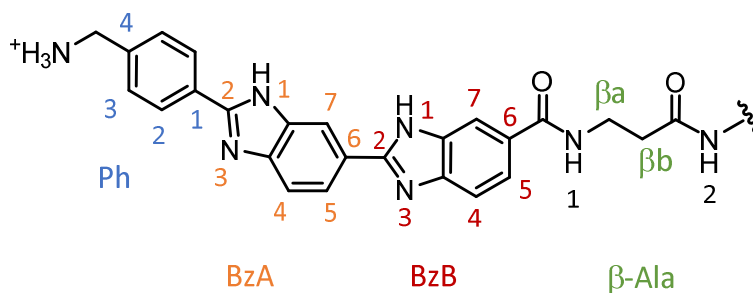
NH- β -D-Manosa



NH- β -L-Glucosa

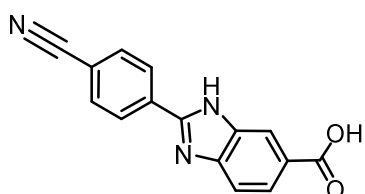


NH- β -L-Manosa



7.6.2. Síntesis de los ácidos derivados de bis(benzimidazol) 15 y 17

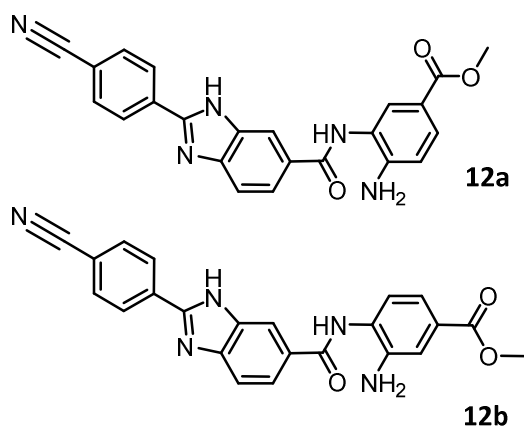
Ácido 2-(4-cianofenil)benzimidazol-5-carboxílico (11)⁵⁹



Se disuelve 4-formilbenzonitrilo (400 mg, 3.05 mmol) y ácido 3,4-diaminobenzoico (464 mg, 3.05 mmol) en 10 ml de etanol. Se disuelve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (580 mg, 3.05 mmol) en 10 ml de agua y se mezcla con la disolución anterior. Se calienta a 130 °C durante 40 minutos en reactor de microondas. Transcurrido ese tiempo, se añade agua (10 ml) apareciendo un precipitado en la mezcla de reacción. Este precipitado se filtra y se lava sucesivamente con agua, acetona y éter etílico. Finalmente se seca a vacío, obteniéndose **11** como un sólido marrón rojizo (778 mg, 2.96 mmol, 97%).

$R_f = 0.58$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$, 3:2:1). $Pf > 300$ °C.⁵⁹ **$^1\text{H-NMR}$** [500 MHz, δ (ppm), $\text{DMSO}-d_6$]: 13.47 (s, 1H, NH), 12.86 (s, 1H, COOH), 8.36 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, Ph-3), 8.23 (s, 1H, BzA-7), 8.06 (d, $J = 8.42$ Hz, 2H, Ph-2), 7.88 (d, $J = 8.36$ Hz, 1H, BzA-5), 7.71 (s, 1H, BzA-4). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), $\text{DMSO}-d_6$]: 167.71 (COOH), 151.62 (C, BzA-2), 133.74 (C, Ph-1), 133.08 (2 \times CH, Ph-3), 127.31 (2 \times CH, Ph-2), 118.52 (CN), 112.42 (C, Ph-4). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 264.0768$, encontrado: 264.0770. **IR** [ν (cm^{-1})]: 3423, 3093, 2231, 1920, 1682, 1624, 1611, 1544, 1489, 1420, 1320, 1223, 1123, 1107, 1018, 963, 947, 896, 849, 772, 754, 693, 676, 621, 551, 497.

Metil N-(2-(4-cianofenil)benzimidazol-5-carbonil-3,4-diaminobenzoato (12a y 12b)⁵⁹

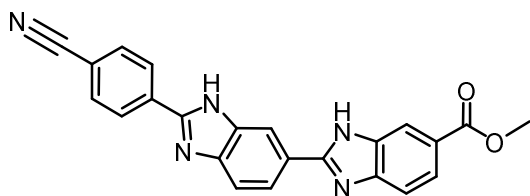


Se disuelve **11** (638 mg, 2.42 mmol), 3,4-diaminobenzoato de metilo (402 mg, 2.42 mmol) y HBTU (971.2 mg, 2.42 mmol) en 20 ml de DMF anhidra bajo atmosfera de argón. Se añade DIPEA (1.27 ml, 7.26 mmol) y se agita durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, el precipitado que aparece se filtra y se lava sucesivamente con agua, acetona y éter etílico. Finalmente se seca a vacío, obteniéndose la mezcla de productos **12a** y **12b** en proporción 1:1 como un sólido marrón pálido (826 mg, 2.0 mmol, 83%).

$R_f = 0.61$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1). $Pf = 222 - 225$ °C.⁵⁹ **$^1\text{H-NMR}$** [400 MHz, δ (ppm), $\text{DMSO}-d_6$]: 13.48 (s, 1H, NHBzAa), 13.44 (s, 1H, NHBzAb), 9.73 (s, 1H, NHa), 9.68 (s, 1H, NHb), 8.47 (s, 1H, BzA-7b), 8.38 (d, $J = 7.06$ Hz, 2H, Ph-2a y b), 8.22 (s, 1H, BzA-7a), 8.07 (d, $J = 8.07$ Hz, 2H, Ph-3a y b), 7.94 (d, $J = 8.55$ Hz, 1H, BzA-5b), 7.92 (d, $J = 8.55$ Hz, 1H, BzA-5a), 7.85 (s, 1H, BzB-7a y b), 7.80 (d, $J = 8.51$ Hz, 1H, BzA-4a), 7.68 (d, $J = 8.51$ Hz, 1H, BzA-4b), 7.60 (d, $J = 8.45$ Hz, 1H, BzB-5a y b), 6.80 (d, $J = 8.52$ Hz, 1H, BzB-4a y b), 5.85 (sa, 2H, NH_2 a y b), 3.77 (s, 3H, OCH_3 a y b). **$^{13}\text{C-NMR}$** [100 MHz, δ (ppm), $\text{DMSO}-d_6$]: 166.13 (CONH a y b), 166.05 (COOMe a y b), 151.61 (C, BzA-2a), 151.01 (C, BzA-2b), 148.38, 148.32, 145.91, 143.21, 137.34, 134.71, 133.89, 133.04, 129.55, 128.87, 128.69, 128.27, 128.20, 127.30, 127.18, 123.66, 122.26, 122.12, 119.37, 118.70, 118.53, 116.17, 114.62, 112.34, 112.24, 111.98, 111.32, 51.32. **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 434.1229$, encontrado: 434.1239; calc para $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{H}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

= 412.1404, encontrado: 412.1424. IR [ν (cm^{-1})]: 3423, 2950, 2228, 1693, 1625, 1516, 1471, 1445, 1296, 1256, 1206, 1155, 1109, 877, 849, 768, 749, 551.

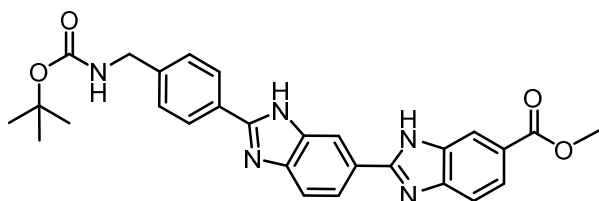
Metil 2-(2-[4-cianofenil]benzimidazol-5-il)-benzimidazol-5-carboxilato (13)⁵⁹



La mezcla de productos **12a** y **12b** (600 mg, 1.46 mmol), se disuelve en 10 ml de ácido acético glacial. Se prepara una disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (201 mg, 1.46 mmol) en agua y se mezcla con la disolución anterior. Se calienta a 150 °C durante una hora en reactor de microondas. Transcurrido ese tiempo, el precipitado que aparece se filtra y se lava sucesivamente con agua, acetona y éter etílico. Finalmente se seca a vacío, obteniéndose **13** como un sólido amarillo pálido (568 mg, 1.44 mmol, 99%).

R_f = 0.69 (Tolueno/MeOH, 8:2). P_f = 257 - 259 °C.⁵⁹ **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.33 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.47 - 8.44 (m, 3H, Ph-2, BzA-7), 8.16 (s, 1H, BzB-7), 8.05 (d, J = 8.12 Hz, 1H, BzA-5), 7.94 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ph-3), 7.78 (d, J = 8.5 Hz, 1H, BzB-5), 7.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H, BzA-4), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 1H, BzB-4), 3.83 (s, 3H, OCH₃). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 166.95 (CO), 155.89 (C, BzB-2), 153.93 (C, BzA-2), 143.87 (C, BzA-3'), 142.08 (C, BzA-7'), 136.37 (C, Ph-1), 132.65 (2 \times CH, Ph-3), 127.24 (2 \times CH, Ph-2), 122.92 (C, BzA-6), 122.70 (C, BzB-3'), 122.56 (2 \times CH, BzB-2, BzB-3), 120.77 (CH, BzA-5), 118.95 (CN), 116.28 (2 \times CH, BzA-4, BzB-7), 114.61 (CH, BzA-7), 110.96 (C, Ph-4), 51.91 (OCH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺ = 394.1299, encontrado: 394.1316. IR [ν (cm^{-1})]: 3427, 3097, 2954, 2230, 1719, 1627, 1576, 1436, 1312, 1227, 1090, 981, 958, 849, 768, 743, 676, 592, 551, 515.

Metil 2-[2-(4-(tert-butoxycarbonil-aminometil)fenil]benzimidazol-5-il)-benzimidazol-5-carboxilato (14)⁵⁹

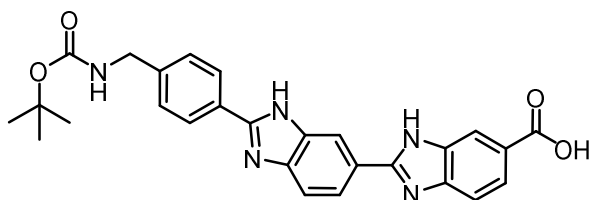


A una disolución de **13** (500 mg, 1.27 mmol,) en 40 ml de metanol anhidro a 0 °C, se añade Boc_2O (555 mg, 2.54 mmol) y $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (19 mg, 0.13 mmol) bajo corriente de argón. Se añade NaBH_4 (483 mg, 12.7 mmol) poco a poco durante 15 minutos y se agita durante 2 horas más, bajo atmosfera de argón. Transcurrido ese tiempo, se añade dietilentriamina (140 μl , 1.27 mmol) y se agita 30 minutos. Posteriormente, el producto precipitado se filtra y

se lava con agua y éter etílico, obteniéndose **14** como un sólido amarillo (454 mg, 0.91 mmol, 72%).

$R_f = 0.19$ (Tolueno/MeOH 9:1). $Pf = 195 - 200\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁵⁹ **$^1\text{H-NMR}$** [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.13 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.42 (s, 1H, BzA-7), 8.20 - 8.16 (m, 3H, BzB-7, Ph-2), 8.11 (d, $J = 8.45$ Hz, 1H, BzA-5), 7.85 (d, $J = 8.38$ Hz, 1H, BzB-5), 7.75 (d, $J = 8.41$ Hz, 1H, BzA-4), 7.68 (d, $J = 8.41$ Hz, 1H, BzB-4), 7.48 (t, $J = 6.33$ Hz, 1H, NHBoc), 7.44 (d, $J = 8.13$ Hz, 2H, Ph-3), 4.22 (d, $J = 6.13$, 2H, CH_2NH), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 1.42 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 166.81 (COOCH_3), 155.84 (CO-Boc), 153.09 (C, BzA-2), 142.51 (C, Ph-4), 128.25 (C, Ph-1), 127.47 ($2\times\text{CH}$, Ph-3), 126.66 ($2\times\text{CH}$, Ph-2), 123.06 (CH, BzB-5), 121.40 (CH, BzA-5), 77.93 (C, Boc), 51.96 (OCH_3), 43.23 (CH_2), 28.25 ($3\times\text{CH}_3$). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 498.2136$, encontrado: 498.2124; calc para $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 520.1961$, encontrado: 520.1930. **IR** [ν (cm^{-1})]: 3421, 2978, 1692, 1624, 1541, 1513, 1495, 1434, 1393, 1367, 1301, 1240, 1166, 1130, 1091, 1048, 1019, 983, 934, 824, 775, 753.

Ácido 2-[2-(4-(tert-butoxycarbonil-aminometil)fenil)benzimidazol-5-il]-benzimidazol-5-carboxílico (15**)**⁵⁹



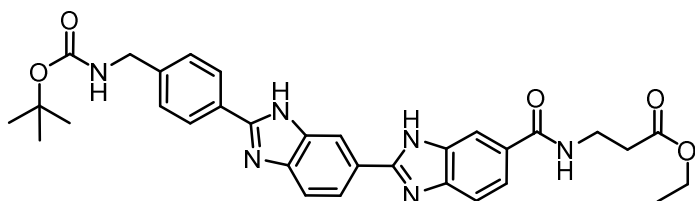
Se disuelve **14** (400 mg, 0.80 mmol) en 10 ml metanol y se añaden 10 ml de una disolución acuosa de KOH (1 M). Se calienta a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos en reactor de microondas. Transcurrido

ese tiempo, la reacción se neutraliza con 10 ml de una disolución acuosa de HCl (1 M) hasta $\text{pH} \approx 7$. El precipitado que aparece se filtra, se lava con agua y se seca, obteniendo **15** como un sólido amarillo (300 mg, 0.62 mmol, 77%).

$Pf = > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁵⁹ **$^1\text{H-NMR}$** [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.06 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.64 (s, 1H, BzA-7), 8.27 (m, 4H, BzB-7, BzA-5, Ph-2), 7.99 (d, $J = 8.49$ Hz, 1H, BzB-5), 7.92 (d, $J = 8.47$ Hz, 1H, BzA-4), 7.81 (d, $J = 8.48$ Hz, 1H, BzB-4), 7.53 (t, $J = 7.29$ Hz, 1H, NHBoc), 7.49 (d, $J = 8.75$ Hz, 2H, Ph-3), 4.24 (d, $J = 6.16$ Hz, 2H, CH_2NH), 1.42 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 167.21 (COOH), 155.86 (CO-Boc), 152.63 (C, BzA-3'), 144.09 (C, Ph-4), 127.63 ($2\times\text{CH}$, Ph-3), 125.79 (C, Ph-1), 125.17 (CH, BzB-5), 122.96 (CH, BzA-5), 115.92 ($2\times\text{CH}$, BzA-4, BzB-7), 114.20 ($2\times\text{CH}$, BzA-7, BzB-4), 78.02 (C, Boc), 43.25 (CH_2), 28.26 ($3\times\text{CH}_3$). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ =$

484.1979, encontrado: 484.2002; calc para $C_{27}H_{25}N_5O_4Na$ $[M+Na]^+ = 506.1804$, encontrado: 506.1819. IR $[v\text{ (cm}^{-1})]$: 3423, 2977, 2932, 1688, 1626, 1574, 1510, 1454, 1368, 1293, 1236, 1166, 823, 772, 661.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala-OEt (16)

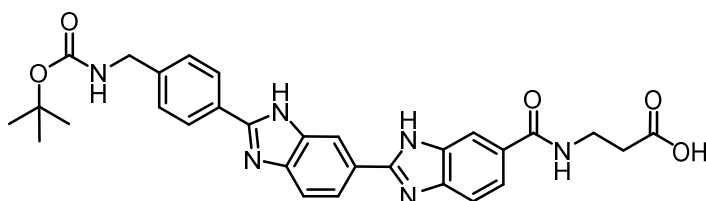


Se disuelve **15** (250 mg, 0.52 mmol), β -Alanina etil éster (87 mg, 0.57 mmol) y HBTU (236 mg, 0.62 mmol) en 25 ml de THF

anhidro bajo atmosfera inerte. Se añade DIPEA (181 μ l, 1.04 mmol) y se agita durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, el sólido que precipita se filtra y se lava con THF y éter etílico, obteniéndose **16** como un sólido marrón (270 mg, 0.46 mmol, 89%).

$R_f = 0.47$ (AcOEt/MeOH 9:1). $^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.13 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.54 (sa, 1H, NH-1), 8.17 (d, $J = 8.17$ Hz, 2H, Ph-2), 8.10 (s, 1H, BzA-7), 7.87 (d, $J = 8.38$ Hz, 1H, BzA-5), 7.71 (s, 1H, BzB-7), 7.59 (d, $J = 8.39$ Hz, 1H, BzB-5), 7.49 (t, $J = 6.21$ Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, $J = 8.06$ Hz, 2H, Ph-3), 7.39 (d, $J = 8.47$ Hz, BzA-4), 7.31 (d, $J = 8.48$ Hz, 1H, BzB-4), 4.22 (d, $J = 6.16$ Hz, 2H, CH_2NHBoc), 4.09 (q, $J = 7.14$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OEt}$), 3.53 (td, $J = 7.07, 5.48$ Hz, 2H, $\beta\text{Ala-a}$), 2.61 (t, $J = 7.06$ Hz, 2H, $\beta\text{Ala-b}$), 1.42 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$), 1.19 (t, $J = 7.09$, 3H, $\text{CH}_3\text{-OEt}$). $^{13}\text{C-NMR}$ [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 171.38 (COOEt), 166.77 (CONH), 155.84 (CO-Boc), 128.24 (C, Ph-1), 127.47 (2 \times CH, Ph-3), 126.64 (3 \times CH, Ph-2, BzA-4), 123.79 (CH, BzB-4), 118.80 (CH, BzA-5), 110.05 (CH, BzB-5), 77.93 (C, Boc), 59.92 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-OEt}$), 43.23 (CH_2 , CH_2NHBoc), 35.63 (CH_2 , $\beta\text{Ala-a}$), 33.94 (CH_2 , $\beta\text{Ala-b}$), 28.26 (3 \times CH $_3$), 14.11 (CH $_3$, $\text{CH}_3\text{-OEt}$). HRMS [ESI+, (m/z)]: calc para $C_{32}H_{35}N_6O_5$ $[M+H]^+ = 583.2663$, encontrado: 583.2709; calc para $C_{32}H_{34}N_6O_5Na$ $[M+Na]^+ = 605.2488$, encontrado: 605.2499. IR $[v\text{ (cm}^{-1})]$: 3424, 2980, 1711, 1641, 1537, 1448, 1369, 1307, 1168, 1026, 853, 744, 559.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala-COOH (17)



Se disuelve **16** (250 mg, 0.43 mmol) en 8 ml metanol y se añaden 8 ml de una disolución acuosa de KOH (1 M). Se calienta a 110 $^{\circ}\text{C}$ durante 30

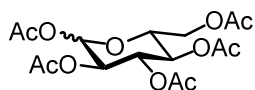
minutos en reactor de microondas. Transcurrido ese tiempo, la reacción se neutraliza con 8 ml de una disolución acuosa de HCl (1 M) hasta pH \approx 7. El precipitado que aparece se filtra, se lava con agua y se seca, obteniendo **17** como un sólido amarillo (231 mg, 0.42 mmol, 97%).

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.45 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 12.20 (sa, 1H, COOH), 8.59 (t, J = 5.43 Hz, 1H, NH1), 8.46 (s, 1H, BzA-7), 8.18 (d, J = 8.02 Hz, 2H, Ph-2), 8.15 (s, 1H, BzB-7), 8.13 (d, J = 8.71 Hz, 1H, BzA-5), 7.80 (d, J = 8.05, 2H Hz, BzA-4, BzB-5), 7.68 (d, J = 8.03 Hz, 1H, BzB-4), 7.50 (t, J = 6.15 Hz, 1H, NH-Boc), 7.46 (d, J = 8.07 Hz, 2H, Ph-3), 4.23 (d, J = 6.13 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.51 (q, J = 6.73 Hz, 2H, β Ala-a), 2.56 (t, J = 7.13, 2H, β Ala-b), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 172.96 (COOH), 166.41 (CONH), 155.85 (CO-Boc), 153.46 (C, BzA-3'), 153.15 (C, BzA-2), 142.93 (C, Ph-4), 127.52 (2 \times CH, Ph-3), 126.84 (2 \times CH, Ph-2), 122.23 (2 \times CH, BzA-4, BzB-5), 121.78 (2 \times CH, BzA-5, BzB-7), 77.96 (C, Boc), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 35.72 (CH₂, β Ala-a), 33.90 (CH₂, β Ala-b), 28.26 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₀H₃₀N₆O₅ [M+H]⁺ = 555.2350, encontrada: 555.2363; calc para C₃₀H₂₉N₆O₅Na [M+Na]⁺ = 577.2175, encontrada: 577.2184. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3425, 2977, 2932, 1690, 1632, 1545, 1451, 1367, 1309, 1251, 1167, 824.

7.6.3. Procedimiento general para la acetilación de monosacáridos (**18a** - e)⁸⁶

A una disolución de monosacárido (1 equiv.) en piridina se le añade anhídrido acético (15 equiv.) La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 6-7 horas. La reacción se para con agua y se añade CH₂Cl₂ (3x) para extraer el producto. Esta fase orgánica se lava con una disolución acuosa de CuSO₄ 10% y una disolución saturada de NaCl. Por último, la fase orgánica se seca sobre NaSO₄, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida.

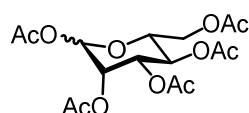
1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α,β -D-Glucopiranososa (AcO₄-D-Glc) (**18a**)⁸⁶



Según el procedimiento general, a partir de D-Glucosa (2 g, 11.1 mmol) se obtiene **18a** como un aceite incoloro (4.11 g, 10.5 mmol, 95%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 2/3 medida por $^1\text{H-RMN}$. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f : 0.45 (Hexano/AcOEt, 5:3). $[\alpha]_D^{25} = +3.9$ ($c = 1.0$, CHCl_3).⁸⁶ **$^1\text{H-NMR}$** [400 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 5.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-1), 5.24 (dd, $J = 9.8, 9.4$ Hz, 1H, H-3), 5.16 - 5.10 (m, 2H, H-2, H-4), 4.29 (dd, $J = 12.6, 4.6$ Hz, 1H, H-6'), 4.11 (dd, $J = 12.6, 2.3$ Hz, 1H, H-6), 3.84 (ddd, $J = 9.8, 4.6, 2.3$ Hz, 1H, H-5), 2.11 (s, 3H, COCH_3), 2.09 (s, 3H, COCH_3), 2.03 (s, 6H, $2 \times \text{COCH}_3$), 2.01 (s, 3H, COCH_3). **$^{13}\text{C-NMR}$** [100 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 170.7 (COCH_3), 170.2 (COCH_3), 169.5 (COCH_3), 169.4 (COCH_3), 169.1 (COCH_3), 91.8 (CH-1), 72.9 (), 72.8 (), 70.3 (), 67.9 (), 61.6 (), 20.9 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 20.7 ($3 \times \text{COCH}_3$). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 413.1057$, encontrado: 413.1060. **IR** [ν (cm^{-1})]: 3029, 2969, 2951, 2907 1755, 1740, 1381, 1372, 1233, 1224, 1046, 914, 704, 642. **Análisis Elemental**: calc para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: C 49.23% H 5.68%, encontrado: C 49.45% H 5.71%

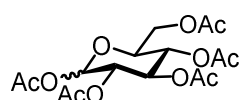
1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α,β -D-Manopiranosas ($\text{AcO}_4\text{-D-Man}$) (**18b**)⁵²



Según el procedimiento general, a partir de D-Manosa (2 g, 11.1 mmol) se obtiene **18b** como un aceite incoloro (4.06 g, 10.4 mmol, 94%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 4/1 medida por $^1\text{H-RMN}$. Se consiguió separar una muestra analítica de anómero α para su caracterización por cromatografía en columna (hexano/acetato 1:1).

R_f : 0.47 (Hexano/AcOEt, 5:3). $[\alpha]_D^{25} = +54.1$ ($c = 1.1$, CHCl_3).⁵² **$^1\text{H-NMR}$** [500 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 6.09 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1), 5.33 - 5.37 (m, 2H, H-3, H-4), 5.25 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2), 4.27 (dd, $J = 12.4, 4.9$ Hz, 1H, H-6'), 4.09 (dd, $J = 12.4, 2.5$ Hz, 1H, H-6), 4.02 - 4.06 (m, 1H, H-5), 2.17 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 2.08 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 2.00 (s, 3H, COCH_3). **$^{13}\text{C-NMR}$** [100 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 170.7 (COCH_3), 170.2 (COCH_3), 169.5 (COCH_3), 169.4 (COCH_3), 169.1 (COCH_3), 91.8 (CH-1), 72.9 (CH-5), 72.8 (CH-3), 70.3 (CH-2), 67.9 (CH-4), 61.6 (CH_2 -6), 20.9 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 20.7 ($3 \times \text{COCH}_3$). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 413.1060$, encontrado: 413.1063. **IR** [ν (cm^{-1})]: 2962, 1752, 1370, 1220, 1149, 1088, 1053, 1026, 974, 755. **Análisis Elemental**: calc para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: C 49.23% H 5.68%, encontrado: C 49.45% H 5.79%

1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α,β -L-Glucopiranosas ($\text{AcO}_4\text{-L-Glc}$) (**18c**)

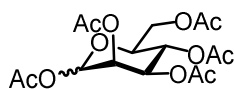


Según el procedimiento general, a partir de L-Glucosa (1 g, 5.5 mmol) se obtiene **18c** como un aceite incoloro (1.97 g, 5.1 mmol,

92%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 2/3 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f: 0.45 (Hexano/AcOEt, 5:3). **[α]_D²⁵** = -4.5 (*c* = 1.0, CHCl₃). **^1H -NMR** [400 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 5.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-1), 5.24 (dd, *J* = 9.8, 9.4 Hz, 1H, H-3), 5.16 - 5.10 (m, 2H, H-2, H-4), 4.29 (dd, *J* = 12.6, 4.6 Hz, 1H, H-6'), 4.11 (dd, *J* = 12.6, 2.3 Hz, 1H, H-6), 3.84 (ddd, *J* = 9.8, 4.6, 2.3 Hz, 1H, H-5), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 2.09 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 6H, 2×COCH₃), 2.01 (s, 3H, COCH₃). **^{13}C -NMR** [100 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 170.7 (COCH₃), 170.2 (COCH₃), 169.5 (COCH₃), 169.4 (COCH₃), 169.1 (COCH₃), 91.8 (CH-1), 72.9 (CH-5), 72.8 (CH-3), 70.3 (CH-2), 67.9 (CH-4), 61.6 (CH-6), 20.9 (COCH₃), 20.8 (COCH₃), 20.7 (3×COCH₃). **HRMS** [ESI+, (*m/z*): calc para C₁₆H₂₂O₁₁Na [M + Na]⁺ = 413.1057, encontrado: 413.1060. **IR** [ν (cm⁻¹): 3029, 2969, 2951, 2907 1755, 1740, 1381, 1372, 1233, 1224, 1046, 914, 704, 642. **Análisis Elemental**: calc para C₁₆H₂₂O₁₁: C 49.23% H 5.68%, encontrado: C 49.52% H 5.85%

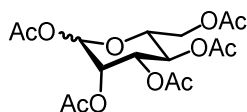
1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α,β -L-Manopiranosas (AcO₄-L-Man) (**18d**)⁵²



Según el procedimiento general, a partir de L-Manosa (2 g, 11.1 mmol) se obtiene **18d** como un aceite incoloro (3.98 g, 10.2 mmol, 92%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 4/1 medida por ^1H -RMN. Se consiguió separar una muestra analítica de anómero α para su caracterización por cromatografía en columna (hexano/acetato 1:1).

R_f: 0.47 (Hexano/AcOEt, 5:3). **[α]_D²⁵** = -54.3 (*c* = 1.1, CHCl₃). **^1H -NMR** [500 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 6.09 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-1), 5.33 - 5.37 (m, 2H, H-3, H-4), 5.25 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-2), 4.27 (dd, *J* = 12.4, 4.9 Hz, 1H, H-6'), 4.09 (dd, *J* = 12.4, 2.5 Hz, 1H, H-6), 4.02 - 4.06 (m, 1H, H-5), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.16 (s, 3H, COCH₃), 2.08 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃). **^{13}C -NMR** [125 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 170.7 (COCH₃), 170.1 (COCH₃), 169.8 (COCH₃), 169.6 (COCH₃), 168.2 (COCH₃), 90.7 (CH-1), 70.7 (CH-5), 68.8 (CH-3), 68.4 (CH-2), 65.6 (CH-4), 62.2 (CH₂-6), 20.99 (COCH₃), 20.89 (COCH₃), 20.84 (COCH₃), 20.78 (COCH₃), 20.76 (COCH₃). **HRMS** [ESI+, (*m/z*): calc para C₁₆H₂₂O₁₁Na [M+Na]⁺ = 413.1060, encontrado: 413.1061. **IR** [ν (cm⁻¹): 2962, 1752, 1370, 1220, 1149, 1088, 1053, 1026, 974, 755. **Análisis Elemental**: calc para C₁₆H₂₂O₁₁: C 49.23% H 5.68%, encontrado: C 49.51% H 5.84%

1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α,β -D-Manopiranos- $^{13}\text{C}_6$ (AcO $_4$ -D-Man- $^{13}\text{C}_6$) (**18e**)



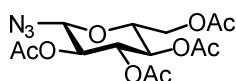
Según el procedimiento general, a partir de D-Manosa- $^{13}\text{C}_6$ (95 mg, 0.51 mmol) se obtiene **18d** como un aceite incoloro (190 mg, 0.47 mmol, 94%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 4/1 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (α) por RMN.

R_f: 0.47 (Hexano/AcOEt, 5:3). **^1H -NMR** [500 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 6.09 (dd, J = 178 Hz, 1.9 Hz, 1H, H-1), 5.47 y 5.08 (m, 2H, H-3, H-4), 5.25 (dd, J = 149, 2.2 Hz, 1H, H-2), 4.27 (ddd, J = 148, 12.4, 4.9 Hz, 1H, H-6'), 4.09 (ddd, J = 148, 12.4, 2.5 Hz, 1H, H-6), 4.04 (d, J = 146 Hz, 1H, H-5), 2.17 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 2.08 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 2.00 (s, 3H, COCH_3). **^{13}C -NMR** [100 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 91.8 (d, J = 44.5 Hz, CH-1), 72.9 (dd, J = 44.9, 41.3 Hz, CH-5), 71.4 (m, CH-3, CH-2), 67.9 (t, J = 40.8 Hz, CH-4), 61.6 (d, J = 45.0 Hz, CH $_2$ -6). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{10}^{13}\text{C}_6\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ = 419.1261, encontrado: 419.1263. **IR** [ν (cm $^{-1}$)]: 2962, 1752, 1370, 1220, 1149, 1088, 1053, 1026, 974, 755. **Análisis Elemental**: calc para $\text{C}_{10}^{13}\text{C}_6\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: C 47.25% H 5.29%, encontrado: C 47.45% H 5.39%

7.6.4. Procedimiento general para la síntesis de glicosil azidas (**19a - e**)⁸⁶

A una disolución del correspondiente carbohidrato acetilado (1 equiv.) y trimetilsilil azida (1 equiv.) en diclorometano a 0°C se le añade poco a poco tetracloruro de estaño (0.85 equiv.) La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. Posteriormente, la reacción se para con agua y se lava con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 . La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución saturada de NaCl y se seca sobre NaSO_4 . Se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida.

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-Glucopiranosil azida (**19a**)⁸⁶

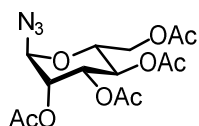


Según el procedimiento general, a partir de **18a** (2.06 g, 5.28 mmol) se obtiene **19a** como un sólido blanco (1.77 g, 4.76 mmol, 90%).

R_f = 0.44 (tolueno/AcOEt, 4:1). **$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$** = -33.0° (c = 2.5, CHCl_3). **^1H -NMR** [400 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 5.22 (dd, J = 9.4, 9.2 Hz, 1H, H-3), 5.09 (dd, J = 9.5, 9.4 Hz, 1H, H-4), 4.95

(dd, $J = 9.2, 8.8$ Hz, 1H, H-2), 4.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-1), 4.27 (dd, $J = 12.4, 4.6$ Hz, 1H, H-6), 4.15 (dd, $J = 12.4, 2.4$ Hz, 1H, H-6'), 3.78 (ddd, $J = 9.8, 4.6, 2.4$ Hz, 1H, H-5), 2.09 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: [ESI+, (m/z)]: calc para C₁₄H₂₃N₄O₉ [M+NH₄]⁺ = 391.1460, encontrado: 391.1456. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 2118, 1756, 1733, 1371, 1242, 1213, 1059, 1039.

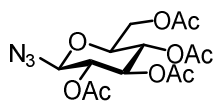
2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-Manopiranosil azida (**19b**)⁵²



Según el procedimiento general, a partir de **18b** (1.95 g, 5.0 mmol) se obtiene **19b** como un sólido blanco (1.77 g, 4.75 mmol, 94%).

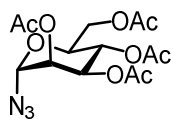
$R_F = 0.43$ (tolueno/AcOEt, 4:1). $[\alpha]_D^{25} = +118$ ($c = 1.5$, CHCl₃). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 5.39 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1), 5.23 - 5.31 (m, 2H, H-3, H-4), 5.15 (dd, $J = 3.0, 1.9$ Hz, 1H, H-2), 4.30 (dd, $J = 12.5, 5.7$ Hz, 1H, H-6'), 4.20 - 4.10 (m, 2H, H-5, H-6), 2.16 (s, 3H, COCH₃), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 1.99 (s, 3H, COCH₃). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 170.7 (COCH₃), 170.0 (COCH₃), 169.9 (COCH₃), 169.8 (COCH₃), 87.6 (CH-1), 70.8 (CH-5), 69.3 (CH-2), 68.4 (CH-3), 65.8 (CH-4), 62.3 (CH₂-6), 21.0 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.8 (2 \times COCH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₁₄H₂₃N₄O₉ [M+NH₄]⁺ = 391.1460, encontrado: 391.1462. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3438, 3390, 2960, 2464, 2125, 1748, 1434, 1371, 1223, 1125, 1085, 1053, 960. **Análisis Elemental**: calc para C₁₄H₁₉ N₃O₉: C 45.04%, H 5.13%, N 11.26%, encontrado C 45.41%, H 5.26%, N 11.12%.

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -L-Glucopiranosil azida (**19c**)⁹³



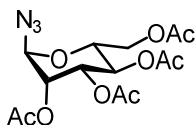
Según el procedimiento general, a partir de **18c** (1.8 g, 4.61 mmol) se obtiene **19c** como un sólido blanco (1.6 g, 4.29 mmol, 93%).

$R_F = 0.44$ (tolueno/AcOEt, 4:1). $[\alpha]_D^{25} = +32.1^\circ$ ($c = 2.6$, CHCl₃). **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 5.22 (dd, $J = 9.4, 9.2$ Hz, 1H, H-3), 5.09 (dd, $J = 9.5, 9.4$ Hz, 1H, H-4), 4.95 (dd, $J = 9.2, 8.8$ Hz, 1H, H-2), 4.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-1), 4.27 (dd, $J = 12.4, 4.6$ Hz, 1H, H-6), 4.15 (dd, $J = 12.4, 2.4$ Hz, 1H, H-6'), 3.78 (ddd, $J = 9.8, 4.6, 2.4$ Hz, 1H, H-5), 2.09 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: [ESI+, (m/z)]: calc para C₁₄H₂₃N₄O₉ [M+NH₄]⁺ = 391.1460, encontrado: 391.1465. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 2118, 1756, 1733, 1371, 1242, 1213, 1059, 1039.

2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -L-Manopiranosil azida (19d**)⁵²**

Según el procedimiento general, a partir de **18d** (2 g, 5.1 mmol) se obtiene **19d** como un sólido blanco (1.85 g, 4.96 mmol, 97%).

R_f = 0.43 (tolueno/AcOEt, 4:1). $[\alpha]_D^{25} = -120.9$ ($c = 3.9$, CHCl_3). **$^1\text{H-NMR}$** [500 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 5.39 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1), 5.23 - 5.31 (m, 2H, H-3, H-4), 5.15 (dd, $J = 3.0$, 1.9 Hz, 1H, H-2), 4.30 (dd, $J = 12.5$, 5.7 Hz, 1H, H-6'), 4.20 - 4.10 (m, 2H, H-5, H-6), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 2.11 (s, 3H, COCH_3), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 1.99 (s, 3H, COCH_3). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 170.7 (COCH_3), 170.0 (COCH_3), 169.9 (COCH_3), 169.8 (COCH_3), 87.6 (CH-1), 70.8 (CH-5), 69.3 (CH-2), 68.4 (CH-3), 65.8 (CH-4), 62.3 (CH_2 -6), 21.0 (COCH_3), 20.9 (COCH_3), 20.8 ($2 \times \text{COCH}_3$). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 391.1460$, encontrado: 391.1457. **IR** [ν (cm^{-1})]: 3637, 3438, 3390, 2960, 2464, 2122, 1748, 1434, 1371, 1223, 1125, 1085, 1053, 960. **Análisis Elemental**: calc para $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_9$: C 45.04%, H 5.13%, N 11.26%, encontrado C 45.14%, H 5.30%, N 11.17%.

2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-Manopiranosil azida- $^{13}\text{C}_6$ (19e**)**

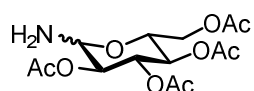
Según el procedimiento general, a partir de **18e** (185 mg, 0.47 mmol) se obtiene **19e** como un sólido blanco (155 mg, 0.41 mmol, 87%).

R_f = 0.43 (tolueno/AcOEt, 4:1). $[\alpha]_D^{25} = +118$ ($c = 1.5$, CHCl_3). **$^1\text{H-NMR}$** [500 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 5.39 (dd, $J = 170$, 1.9 Hz, 1H, H-1), 5.42 y 5.05 (m, 2H, H-3, H-4), 5.15 (dd, $J = 154$, 3.0 Hz, 1H, H-2), 4.30 (ddd, $J = 151$, 12.5, 5.7 Hz, 1H, H-6'), 4.32 y 3.95 (m, 2H, H-5, H-6), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 2.11 (s, 3H, COCH_3), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 1.99 (s, 3H, COCH_3). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 87.6 (d, $J = 44.2$ Hz, CH-1), 70.8 (t, $J = 42.5$ Hz, CH-5), 69.3 (t, $J = 41.1$ Hz, CH-2), 68.4 (t, $J = 40.0$ Hz, CH-3), 65.8 (t, $J = 41.1$ Hz, CH-4), 62.3 (d, $J = 45.0$ Hz, CH_2 -6). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_8^{13}\text{C}_6\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 397.1661$, encontrado: 397.1663. **IR** [ν (cm^{-1})]: 3438, 3390, 2960, 2464, 2125, 1748, 1434, 1371, 1223, 1125, 1085, 1053, 960. **Análisis Elemental**: calc para $\text{C}_8^{13}\text{C}_6\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_9$: C 45.91%, H 5.05%, N 11.08%, encontrado C 46.11%, H 5.32%, N 10.95%.

7.6.5. Procedimiento general para la reducción de glicosil azidas (**20a - e**)⁸⁶

A una disolución de la correspondiente glicosil azida en metanol se le añade Pd/C (10%) y se agita 4 - 5 horas bajo atmósfera de hidrógeno. Transcurrido ese tiempo, el catalizador se separa por filtración empleando un filtro de nylon y se elimina el disolvente a presión reducida.

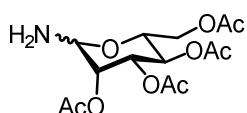
2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α,β -D-Glucopiranosil amina (**20a**)⁸⁶



Según el procedimiento general, a partir de **19a** (1.6 g, 4.29 mmol) se obtiene **20a** como un sólido blanco (1.3 g, 3.77 mmol, 88%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/5 medida por ¹H-RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f = 0.11 (hexano/AcOEt, 1:2). $[\alpha]_D^{25}$ = +11.1° (c = 0.54, CHCl₃).⁸⁶ **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 5.28 (dd, J = 9.5, 9.3 Hz, 1H, H-3), 5.03 (dd, J = 9.9, 9.3 Hz, 1H, H-4), 4.82 (dd, J = 9.9, 9.0 Hz, 1H, H-2), 4.16 - 4.26 (m, 2H, H-6, H1), 4.12 (dd, J = 12.3, 2.4 Hz, 1H, H-6'), 3.70 (ddd, J = 9.90, 4.8, 2.4 Hz, 1H, H-5), 2.08 (s, 3H, COCH₃), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 2.01 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₁₄H₂₂NO₉ [M+H]⁺ = 348.1289, encontrado: 348.1286. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 1755, 1732, 1378, 1244, 1226, 1038.

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α,β -D-Manopiranosil amina (**20b**)⁵²

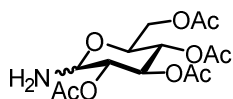


Según el procedimiento general, a partir de **19b** (1.67 g, 4.47 mmol) se obtiene **20b** como un sólido blanco (1.47 g, 4.23 mmol, 95%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/6 medida por ¹H-RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f = 0.12 (hexano/AcOEt, 1:2). $[\alpha]_D^{25}$ = -11.6 (c = 5.0, CHCl₃).⁵² **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 5.40 (dd, J = 3.4, 1.2 Hz, 1H, H-2), 5.19 (dd, J = 10.0, 10.0 Hz, 1H, H-4), 5.06 (dd, J = 10.0, 3.4 Hz, 1H, H-3), 4.45 (sa, 1H, H-1), 4.25 (dd, J = 12.3, 5.6 Hz, 1H, H-6'), 4.11 (dd, J = 12.3, 2.4 Hz, 1H, H-6), 3.66 (ddd, J = 10.0, 5.6, 2.4 Hz, 1H, H-5), 2.20 (s, 3H, COCH₃), 2.10 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃), 1.98 (s, 3H, COCH₃). **¹³C-NMR** [100 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 170.9 (COCH₃), 170.4 (COCH₃), 170.2 (COCH₃), 169.9 (COCH₃), 73.5 (CH-1), 72.2 (CH-5), 70.8 (CH-3), 66.0 (CH-2), 63.0 (CH₂-6), 62.9 (CH-4), 21.1 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.7 (COCH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₁₄H₂₂NO₉ [M+H]⁺ =

348.1289, encontrado: 348.1293. IR [ν (cm^{-1})]: 3412, 2927, 1748, 1636, 1432, 1368, 1280, 1219, 1120, 1063, 1041, 961.

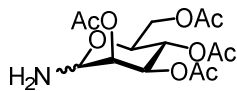
2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α,β -L-Glucopiranosil amina (20c)



Según el procedimiento general, a partir de **19c** (500 mg, 1.34 mmol) se obtiene **20c** como un sólido blanco (451 mg, 1.30 mmol, 97%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/5 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

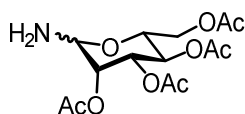
$R_f = 0.11$ (hexano/AcOEt, 1:2). $[\alpha]_D^{25} = -12.0^\circ$ ($c = 0.62$, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 5.28 (dd, $J = 9.5, 9.3$ Hz, 1H, H-3), 5.03 (dd, $J = 9.9, 9.3$ Hz, 1H, H-4), 4.82 (dd, $J = 9.9, 9.0$ Hz, 1H, H-2), 4.16 - 4.26 (m, 2H, H-6, H1), 4.12 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1H, H-6'), 3.70 (ddd, $J = 9.90, 4.8, 2.4$ Hz, 1H, H-5), 2.08 (s, 3H, COCH_3), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 2.01 (s, 3H, COCH_3), 2.00 (s, 3H, COCH_3). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_9$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 348.1289, encontrado: 348.1294. IR [ν (cm^{-1})]: 1755, 1732, 1378, 1244, 1226, 1038.

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α,β -L-Manopiranosil amina (20d)⁵²



Según el procedimiento general, a partir de **19d** (804 mg, 2.15 mmol) se obtiene **20d** como un sólido blanco (627 mg, 1.80 mmol, 84%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/6 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

$R_f = 0.12$ (hexano/AcOEt, 1:2). $[\alpha]_D^{25} = +8.3$ ($c = 4.1$, CHCl_3).⁵² $^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 5.40 (dd, $J = 3.4, 1.2$ Hz, 1H, H-2), 5.19 (dd, $J = 10.0, 10.0$ Hz, 1H, H-4), 5.06 (dd, $J = 10.0, 3.4$ Hz, 1H, H-3), 4.45 (sa, 1H, H-1), 4.25 (dd, $J = 12.3, 5.6$ Hz, 1H, H-6'), 4.11 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1H, H-6), 3.66 (ddd, $J = 10.0, 5.6, 2.4$ Hz, 1H, H-5), 2.20 (s, 3H, COCH_3), 2.10 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 1.98 (s, 3H, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ [100 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 170.9 (COCH_3), 170.4 (COCH_3), 170.2 (COCH_3), 169.9 (COCH_3), 73.5 (CH-1), 72.2 (CH-5), 70.8 (CH-3), 66.0 (CH-2), 63.0 (CH-6), 62.9 (CH-4), 21.1 (COCH_3), 21.0 (COCH_3), 20.9 (COCH_3), 20.7 (COCH_3). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_9$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 348.1289, encontrado: 348.1295. IR [ν (cm^{-1})]: 3412, 2927, 1748, 1636, 1432, 1368, 1280, 1219, 1120, 1063, 1041, 961.

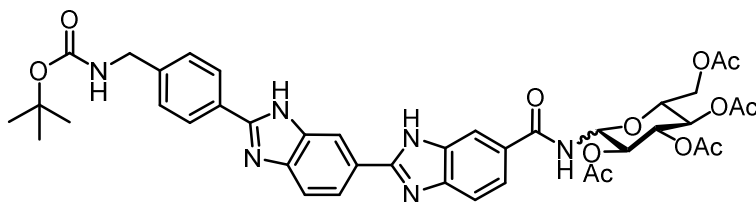
2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α,β -D-Manopiranosil amina- $^{13}\text{C}_6$ 

Según el procedimiento general, a partir de **20e** (150 mg, 0.39 mmol) se obtiene **19e** como un sólido blanco (117 mg, 0.33 mmol, 85%). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/6 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

$R_f = 0.12$ (hexano/AcOEt, 1:2). $^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 5.40 (ddd, $J = 151, 3.4, 1.2$ Hz, 1H, H-2), 5.19 (ddd, $J = 153, 10.0, 10.0$ Hz, 1H, H-4), 5.06 (ddd, $J = 146, 10.0, 3.4$ Hz, 1H, H-3), 4.45 (d, $J = 153$ Hz, 1H, H-1), 4.25 (ddd, $J = 148, 12.3, 5.6$ Hz, 1H, H-6'), 4.11 (ddd, $J = 148, 12.3, 2.4$ Hz, 1H, H-6), 3.66 (ddd, $J = 143, 10.0, 5.6$ Hz, 1H, H-5), 2.20 (s, 3H, COCH_3), 2.10 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 1.98 (s, 3H, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ [100 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 73.5 (d, $J = 42.6$, CH-1), 72.2 (t, $J = 42.2$ Hz, CH-5), 70.8 (t, $J = 42.7$ Hz, CH-3), 66.0 (t, $J = 42.7$ Hz, CH-2), 63.0 (d, $J = 44.9$ Hz, CH_2 -6), 62.9 (t, $J = 40.5$ Hz, CH-4). **HRMS** [ESI+, (m/z): calc para $\text{C}_8^{13}\text{C}_6\text{H}_{22}\text{NO}_9$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 354.1490, encontrado: 354.1497. **IR** [ν (cm^{-1}): 3412, 2927, 1748, 1636, 1432, 1368, 1280, 1219, 1120, 1063, 1041, 961.

7.6.6. Procedimiento general para el acoplamiento vector - carbohidrato/ciclohexilo

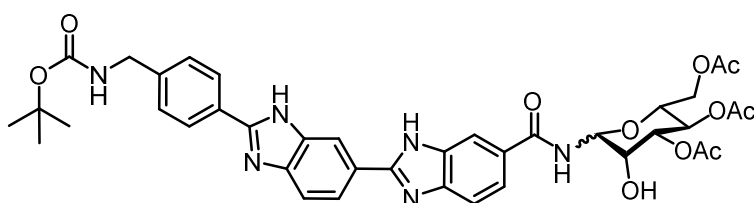
Se disuelve el vector (**15** o **17**, 1 equiv.), las glicosilaminas (**20a - e**) o el ciclohexilo (2 equiv.) y HBTU (1.5 equiv) en DMF anhidra bajo atmosfera de argón. Se añade DIPEA (3 equiv.) y se agita durante 2 - 48 horas dependiendo del compuesto (ver Figura 5.17). Transcurrido ese tiempo, el disolvente se evapora a presión reducida y el producto se purifica por cromatografía en columna.

Boc-bis(benzimidazol)- α,β -D-Glc(AcO) $_4$ (21a**)**

Según el procedimiento general, a partir de **15** (200 mg, 0.41 mmol) y **20a** (285 mg, 0.82 mmol), se obtiene **21a** como un sólido amarillo (250 mg, 0.31 mmol, 75%) tras purificación por cromatografía en columna ($\text{AcOEt} \rightarrow \text{AcOEt/MeOH } 9:1$). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/5 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

$R_f = 0.62$ (AcOEt/MeOH 9:1). **$^1\text{H-NMR}$** [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.15 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 9.20 (sa, 1H, NH), 8.49 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, $J = 7.97$ Hz, 2H, Ph-2), 8.12 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.76 (m, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.65 (d, $J = 7.91$ Hz, 1H, BzB-4), 7.44 (d, $J = 8.04$ Hz, 2H, Ph-3), 5.67 (t, $J = 9.29$ Hz, 1H, $\beta\text{Glc-1}$), 5.44 (t, $J = 9.44$ Hz, 1H, $\beta\text{Glc-3}$), 5.17 (t, $J = 9.37$ Hz, 1H, $\beta\text{Glc-2}$), 4.96 (t, $J = 9.73$ Hz, 1H, $\beta\text{Glc-4}$), 4.21 (m, 4H, $\beta\text{Glc-5}$, $\beta\text{Glc-6'}$, CH_2NHBoc), 4.03 (d, $J = 10.63$ Hz, 1H, $\beta\text{Glc-6}$), 2.02 (s, 3H, COCH_3), 2.01 (s, 3H, COCH_3), 1.97 (s, 3H, COCH_3), 1.92 (s, 3H, COCH_3), 1.42 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 170.02 (COCH_3), 169.57 (COCH_3), 169.37 (COCH_3), 169.14 (COCH_3), 167.15 (CONH), 155.86 (CO-Boc), 142.53 (C, Ph-4), 128.24 (C, Ph-1), 127.49 ($2\times\text{CH}$, Ph-3), 126.66 ($2\times\text{CH}$, Ph-2), 121.75 (CH, BzB-5), 121.30 (CH, BzA-5), 118.68 (CH, BzA-4), 118.16 (CH, BzB-7), 117.09 (BzA-7), 111.13 (BzB-4), 77.94 (C, Boc), 77.77 (CH, $\beta\text{Glc-1}$), 73.00 (CH, $\beta\text{Glc-3}$), 72.16 (CH, $\beta\text{Glc-5}$), 70.82 (CH, $\beta\text{Glc-2}$), 67.93 (CH, $\beta\text{Glc-4}$), 61.70 (CH_2 , $\beta\text{Glc-6}$), 43.30 (CH_2 , CH_2NHBoc), 28.26 ($3\times\text{CH}_3$), 20.55 (CH_3 , COCH_3), 20.42 (CH_3 , COCH_3), 20.37 (CH_3 , COCH_3), 20.35 (CH_3 , COCH_3). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $\text{C}_{41}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 813.3090$, encontrado: 813.3081; calc para $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 835.2915$, encontrado: 835.2875. **IR** [ν (cm^{-1})]: 3418, 2978, 2936, 1749, 1676, 1524, 1447, 1369, 1234, 1167, 1040, 980, 853, 742, 602, 559.

Boc-bis(benzimidazol)- α,β -D-Man(AcO)₄ (**21b**)



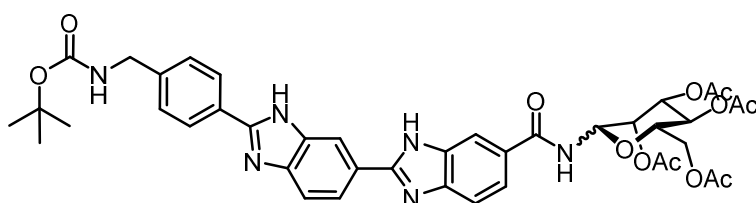
Según el procedimiento general, a partir de **15** (300 mg, 0.62 mmol) y **20b** (431 mg, 1.24 mmol), se obtiene **21b** como un sólido

amarillo (327 mg, 0.40 mmol, 65%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt \rightarrow AcOEt/MeOH 9:1). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/5 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

$R_f = 0.62$ (AcOEt/MeOH 9:1). **$^1\text{H-NMR}$** [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.19 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 9.06 (sa, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, $J = 7.80$ Hz, 2H, Ph-2), 8.11 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.79 (d, $J = 8.02$ Hz, 1H, BzB-5), 7.73 (m, 2H, BzA-4, BzB-4), 7.50 (t, $J = 5.99$ Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, $J = 7.44$ Hz, 2H, Ph-3), 5.96 (d, $J = 8.51$ Hz, 1H, $\beta\text{Man-1}$), 5.42 (dd, $J = 10.08, 3.46$ Hz, 1H, $\beta\text{Man-3}$), 5.35 (d, $J = 3.37$ Hz, 1H, $\beta\text{Man-2}$), 5.13 (t, $J = 9.90$ Hz, 1H, $\beta\text{Man-4}$), 4.24 - 4.18 (m, 3H, CH_2NHBoc , $\beta\text{Man-6'}$), 4.11 (ddd, $J = 10.3, 5.10, 2.36$ Hz, 1H, $\beta\text{Man-5}$), 4.04 (dd, $J = 12.33, 2.20$ Hz, 1H, $\beta\text{Man-6}$), 2.23 (s, 3H, COCH_3),

2.05 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 170.50 (COCH₃), 170.14 (COCH₃), 169.68 (COCH₃), 169.58 (COCH₃), 166.96 (CONH), 155.88 (CO-Boc), 142.61 (C, Ph-4), 128.19 (C, Ph-1), 127.51 (2 \times CH, Ph-3), 127.13 (CH, BzA-7), 126.71 (2 \times CH, Ph-2), 122.09 (CH, BzA-4), 121.10 (2 \times CH, BzA-5, BzB-7), 122.04 (CH, BzB-5), 109.25 (CH, BzB-4), 79.00 (C, Boc), 77.35 (CH, β Man-1), 73.01 (CH, β Man-5), 71.00 (CH, β Man-3), 69.41 (CH, β Man-2), 65.48 (CH, β Man-4), 62.29 (CH₂, β Man-6), 43.25 (CH₂, CH₂NHBoc), 28.29 (3 \times CH₃), 21.19 (CH₃, COCH₃), 20.66 (2 \times CH₃, COCH₃), 20.45 (CH₃, COCH₃). **HRMS** [ESI⁺, (m/z)]: calc para C₄₁H₄₅N₆O₁₂ [M+H]⁺ = 813.3090, encontrado: 813.3111; calc para C₄₁H₄₄N₆O₁₂Na [M+Na]⁺ = 835.2915, encontrado: 835.2941. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3415, 2976, 2929, 1750, 1687, 1523, 1449, 1368, 1231, 1167, 1101, 1054, 962, 909, 852, 746, 599, 559.

Boc-bis(benzimidazol)- α,β -L-Man(AcO)₄ (**21c**)



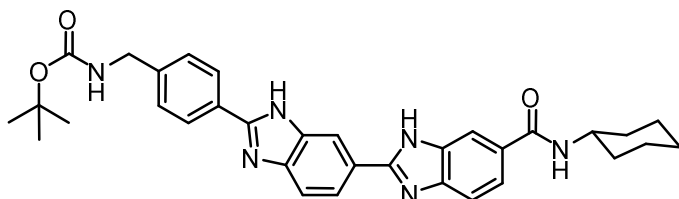
Según el procedimiento general, a partir de **15** (200 mg, 0.41 mmol) y **20d** (285 mg, 0.82 mmol), se obtiene **21c** como un sólido

amarillo (200 mg, 0.25 mmol, 61%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt \rightarrow AcOEt/MeOH 9:1). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/5 medida por ¹H-RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f = 0.62 (AcOEt/MeOH 9:1). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 13.19 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 9.06 (sa, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, *J* = 7.80 Hz, 2H, Ph-2), 8.11 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.79 (d, *J* = 8.02 Hz, 1H, BzB-5), 7.73 (m, 2H, BzA-4, BzB-4), 7.15 (t, *J* = 5.99 Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, *J* = 7.44 Hz, 2H, Ph-3), 5.96 (d, *J* = 8.51 Hz, 1H, β Man-1), 5.42 (dd, *J* = 10.08, 3.46 Hz, 1H, β Man-3), 5.35 (d, *J* = 3.37 Hz, 1H, β Man-2), 5.13 (t, *J* = 9.90 Hz, 1H, β Man-4), 4.24 - 4.18 (m, 3H, CH₂NHBoc, β Man-6'), 4.11 (ddd, *J* = 10.3, 5.10, 2.36 Hz, 1H, β Man-5), 4.04 (dd, *J* = 12.33, 2.20 Hz, 1H, β Man-6), 2.23 (s, 3H, COCH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 170.50 (COCH₃), 170.14 (COCH₃), 169.68 (COCH₃), 169.58 (COCH₃), 166.96 (CONH), 155.88 (CO-Boc), 142.61 (C, Ph-4), 128.19 (C, Ph-1), 127.51 (2 \times CH, Ph-3), 127.13 (CH, BzA-7), 126.71 (2 \times CH, Ph-2), 122.09 (CH, BzA-4), 121.10 (2 \times CH, BzA-5, BzB-7), 122.04 (BzB-5), 109.25 (CH, BzB-4), 78.98 (C, Boc), 77.35 (CH, β Man-1), 73.01 (CH, β Man-5), 71.00 (CH, β Man-3), 69.41 (CH, β Man-2), 65.48 (CH,

β Man-4), 62.29 (CH₂, β Man-6), 43.25 (CH₂, CH₂NHBoc), 28.29 (3 \times CH₃), 21.19 (CH₃, COCH₃), 20.66 (2 \times CH₃, COCH₃), 20.45 (CH₃, COCH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₄₁H₄₅N₆O₁₂ [M+H]⁺ = 813.3090, encontrado: 813.3071; calc para C₄₁H₄₄N₆O₁₂Na [M+Na]⁺ = 835.2915, encontrado: 835.2884. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3418, 2978, 2935, 1749, 1688, 1523, 1444, 1368, 1231, 1166, 1102, 1054, 962, 913, 852, 773, 740, 600, 559.

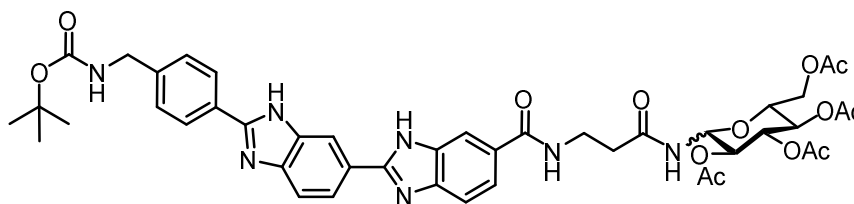
Boc-bis(benzimidazol)-Cy (21d)



Según el procedimiento general, a partir de **15** (100 mg, 0.20 mmol) y ciclohexilamina (45 μ l, 0.41

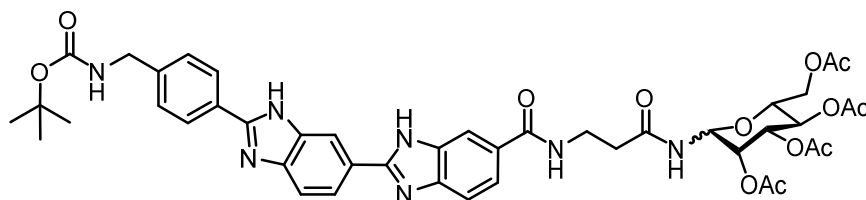
mmol), se obtiene **21d** como un sólido amarillo (80 mg, 0.14 mmol, 71%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt \rightarrow AcOEt/MeOH 9:1).

¹H-NMR [500 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 13.13 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.46 (sa, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, BzA-7), 8.16 (d, *J* = 8.26 Hz, 2H, Ph-2), 8.11 (s, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.74 (s, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.58 (s, 1H, BzB-4), 7.49 (t, *J* = 6.24 Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, *J* = 8.12 Hz, 2H, Ph-3), 4.22 (d, *J* = 6.19 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.80 (tdt, *J* = 11.07, 7.80, 3.70 Hz, 1H, Cy-1), 1.86 (m, 2H, Cy-2'), 1.74 (m, 2H, Cy-3'), 1.62 (m, 1H, Cy-4'), 1.36 (m, 2H, Cy-3), 1.33 (m, 2H, Cy-2), 1.17 (dtt, *J* = 15.43, 8.94, 2.41 Hz, 1H, Cy-4). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 166.25 (CONH), 156.29 (CO-Boc), 142.96 (C, Ph-4), 128.67 (C, Ph-1), 127.92 (2 \times CH, Ph-3), 127.08 (2 \times CH, Ph-2), 78.39 (C, Boc), 48.82 (CH, Cy-1), 43.68 (CH₂, CH₂NHBoc), 32.99 (2 \times CH₂, Cy-2), 28.70 (3 \times CH₃), 25.78 (CH, Cy-4), 25.48 (2 \times CH₂, Cy-2). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₃H₃₇N₃O₃ [M+H]⁺ = 565.2922 encontrado: 565.2901. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3417, 2970, 2875, 1679, 1624, 1533, 1443, 1366, 1328, 1247, 1162, 1112, 1051, 823, 743.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- α,β -D-Glc(AcO)₄ (22a**)**

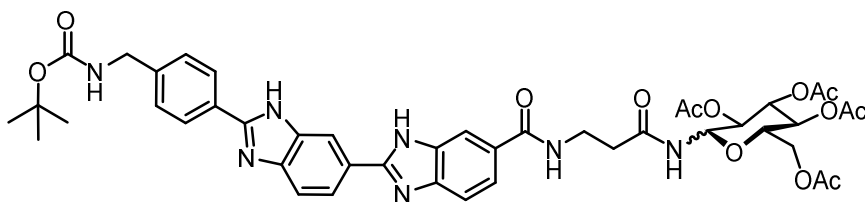
Según el procedimiento general, a partir de **17** (80 mg, 0.14 mmol) y **20a** (97 mg, 0.28 mmol), se obtiene **22a** como un sólido amarillo (90 mg, 0.10 mmol, 75%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt \rightarrow AcOEt/MeOH 9:1). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/6.5 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f = 0.47 (AcOEt/MeOH 9:1). $^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.13 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.79 (d, J = 9.47 Hz, 1H, NH-1), 8.48 (sa, 1H, NH-2), 8.41 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, J = 7.96 Hz, 2H, Ph-2), 8.10 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.72 (d, J = 8.39 Hz, 2H, BzB5, BzA-4), 7.62 (m, 1H, BzB-4), 7.48 (t, J = 6.37 Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, J = 8.32 Hz, 2H, Ph-3), 5.43 (t, J = 9.42 Hz, 1H, β Glc-1), 5.35 (t, J = 9.52 Hz, 1H, β Glc-3), 4.89 (t, J = 9.85 Hz, 1H, β Glc-4), 4.83 (t, J = 9.84 Hz, 1H, β Glc-2), 4.22 (d, J = 6.13 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 4.16 (dd, J = 12.23, 4.46 Hz, 1H, β Glc-6'), 4.10 (dt, J = 10.90, 3.04 Hz, 1H, β Glc-5), 3.97 (dd, J = 12.00, 1.37 Hz, 1H, β Glc-6), 3.48, (dt, J = 12.16, 6.97 Hz, 2H, β Ala-a), 2.46 (m, 2H, β Ala-b), 1.99 (s, 6H, 2 \times COCH₃), 1.92 (s, 3H, COCH₃), 1.88 (s, 3H, COCH₃), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). $^{13}\text{C-NMR}$ [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 171.18 (CONH), 169.98 (CO), 169.49 (CO), 169.30 (CO), 169.05 (CO), 155.85 (CO-Boc), 142.50 (C, Ph-4), 128.24 (C, Ph-1), 127.47 (2 \times CH, Ph-3), 126.64 (2 \times CH, Ph-3), 121.15 (3 \times CH, BzA-5, BzB-5, BzA-4), 109.89 (CH, BzB-4), 77.94 (C, Boc), 76.75 (CH, β Glc-1), 72.85 (CH, β Glc-3), 72.07 (CH, β Glc-5), 70.66 (CH, β Glc-2), 67.82 (CH, β Glc-4), 61.72 (CH₂, β Glc-6), 43.23 (CH₂, CH₂NHBoc), 35.82 (CH₂, β Ala-a), 35.30 (CH₂, β Ala-b), 28.25 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI⁺, (m/z)]: calc para C₄₄H₅₀N₇O₁₃ [M+H]⁺ = 884.3461, encontrado: 884.3485; calc para C₄₄H₄₉N₇O₁₃Na [M+Na]⁺ = 906.3286, encontrado: 906.3309. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3411, 2977, 1753, 1688, 1641, 1535, 1447, 1368, 1233, 1167, 1040, 908, 852, 746, 601, 559.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- α,β -D-Man(AcO)₄ (22b**)**

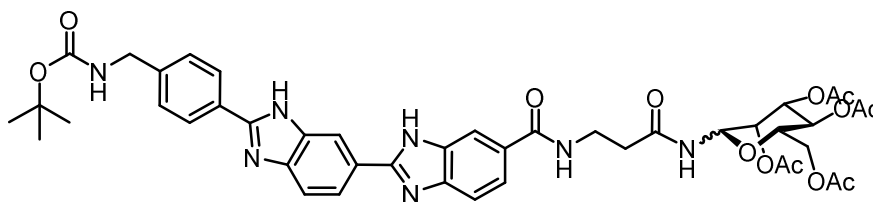
Según el procedimiento general, a partir de **17** (100 mg, 0.18 mmol) y **20b** (125 mg, 0.36 mmol), se obtiene **22b** como un sólido amarillo (115 mg, 0.13 mmol, 72%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt \rightarrow AcOEt/MeOH 9:1). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/6.5 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f = 0.57 (AcOEt/MeOH 9:1). ^1H -NMR [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.15 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.63 (d, J = 8.96 Hz, 1H, NH-1), 8.50 (t, J = 4.82 Hz, 1H, NH-2), 8.41 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, J = 8.21 Hz, 3H, Ph-2, BzB-7), 8.10 (d, J = 8.81 Hz, 1H, BzA-5), 7.72 (m, 2H, BzA-4, BzB-5), 7.60 (d, J = 8.79 Hz, 1H, BzB-4), 7.49 (t, J = 6.21 Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, J = 8.19 Hz, 2H, Ph-3), 5.70 (dd, J = 8.97, 1.42 Hz, 1H, β Man-1), 5.34 (dd, J = 10.14, 3.43 Hz, 1H, β Man-3), 5.21 (dd, J = 3.45, 1.37 Hz, 1H, β Man-2), 5.04 (t, J = 9.98 Hz, 1H, β Man-4), 4.22 (d, J = 6.18 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 4.16 (dd, J = 12.16, 4.73 Hz, 1H, β Man-6'), 4.01 (ddd, J = 9.98, 4.71, 2.45 Hz, 1H, β Man-5), 3.98 (dd, J = 12.27, 2.46 Hz, 1H, β Man-6), 3.48 (q, J = 6.90 Hz, 2H, β Ala-a), 2.53 (m, 2H, β Ala-b), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 1.91 (s, 3H, COCH₃), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). ^{13}C -NMR [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 170.61 (CONH), 170.22 (COCH₃), 170.04 (COCH₃), 169.55 (COCH₃), 169.47 (COCH₃), 166.74 (CONH- β Ala-b), 155.85 (CO-Boc), 142.51 (C, Ph-4), 128.25 (C, Ph-1), 127.48 (2 \times CH, Ph-3), 126.65 (2 \times CH, Ph-2), 121.19 (3 \times CH, BzA-5, BzA-4, BzB-5), 110.07 (CH, BzB-4), 77.94 (C, Boc), 75.93 (CH, β Man-1), 72.58 (CH, β Man-5), 70.86 (CH, β Man-3), 69.26 (CH, β Man-2), 65.29 (CH, β Man-4), 62.10 (CH₂, β Man-6), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 35.71 (CH₂, β Ala-a), 34.95 (CH₂, β Ala-b), 28.26 (3 \times CH₃). HRMS [ESI⁺, (m/z)]: calc para C₄₄H₅₀N₇O₁₃ [M+H]⁺ = 884.3461, encontrado: 884.3496; calc para C₄₄H₄₉N₇O₁₃Na [M+Na]⁺ = 906.3286, encontrado: 906.3314. IR [ν (cm⁻¹)]: 3407, 2978, 2936, 1752, 1686, 1641, 1535, 1445, 1368, 1230, 1167, 1103, 1055, 960, 851, 746, 599, 558.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- α,β -L-Glc(AcO)₄ (22c**)**

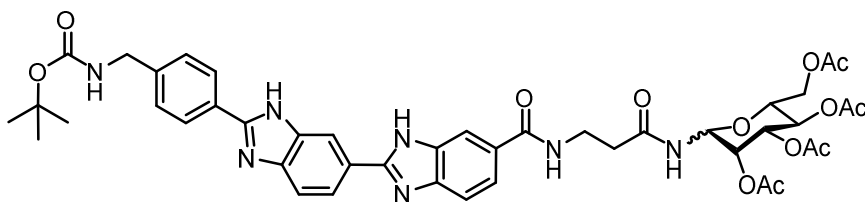
Según el procedimiento general, a partir de **17** (122 mg, 0.22 mmol) y **20c** (153 mg, 0.44 mmol), se obtiene **22c** como un sólido amarillo (136 mg, 0.15 mmol, 70%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt → AcOEt/MeOH 9:1). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/6.5 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f = 0.47 (AcOEt/MeOH 9:1). $^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.13 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.79 (d, J = 9.47 Hz, 1H, NH-1), 8.48 (sa, 1H, NH-2), 8.41 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, J = 7.96 Hz, 2H, Ph-2), 8.10 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.72 (d, J = 8.39 Hz, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.62 (m, 1H, BzB-4), 7.48 (t, J = 6.37 Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, J = 8.32 Hz, 2H, Ph-3), 5.43 (t, J = 9.42 Hz, 1H, β Glc-1), 5.35 (t, J = 9.52 Hz, 1H, β Glc-3), 4.89 (t, J = 9.85 Hz, 1H, β Glc-4), 4.83 (t, J = 9.84 Hz, 1H, β Glc-2), 4.22 (d, J = 6.13 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 4.16 (dd, J = 12.23, 4.46 Hz, 1H, β Glc-6'), 4.10 (dt, J = 10.90, 3.04 Hz, 1H, β Glc-5), 3.97 (dd, J = 12.00, 1.37 Hz, 1H, β Glc-6), 3.48, (dt, J = 12.16, 6.97 Hz, 2H, β Ala-a), 2.46 (m, 2H, β Ala-b), 1.99 (s, 6H, 2 \times COCH₃), 1.92 (s, 3H, COCH₃), 1.88 (s, 3H, COCH₃), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). $^{13}\text{C-NMR}$ [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 171.18 (CONH), 169.98 (CO), 169.49 (CO), 169.30 (CO), 169.05 (CO), 155.85 (CO-Boc), 142.50 (C, Ph-4), 128.24 (C, Ph-1), 127.47 (2 \times CH, Ph-3), 126.64 (2 \times CH, Ph-3), 121.15 (3 \times CH, BzA-5, BzB-5, BzA-4), 109.89 (CH, BzB-4), 77.94 (C, Boc), 76.75 (CH, β Glc-1), 72.85 (CH, β Glc-3), 72.07 (CH, β Glc-5), 70.66 (CH, β Glc-2), 67.82 (CH, β Glc-4), 61.72 (CH₂, β Glc-6), 43.23 (CH₂, CH₂NHBoc), 35.82 (CH₂, β Ala-a), 35.30 (CH₂, β Ala-b), 28.25 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z): calc para C₄₄H₅₀N₇O₁₃ [M+H]⁺ = 884.3461, encontrado: 884.3425; calc para C₄₄H₄₉N₇O₁₃Na [M+Na]⁺ = 906.3286, encontrado: 906.3243. **IR** [ν (cm⁻¹): 3408, 2978, 2937, 1754, 1687, 1640, 1535, 1447, 1368, 1232, 1167, 1040, 850, 746, 600, 558.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- α,β -L-Man(AcO)₄ (22d**)**

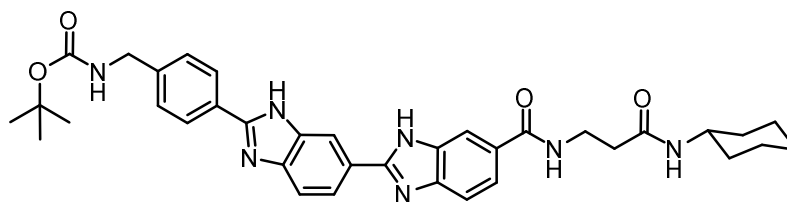
Según el procedimiento general, a partir de **17** (200 mg, 0.36 mmol) y **20d** (250 mg, 0.72 mmol), se obtiene **22d** como un sólido amarillo (219 mg, 0.25 mmol, 69%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt → AcOEt/MeOH 9:1). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/6.5 medida por ^1H -RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f = 0.57 (AcOEt/MeOH 9:1). $^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.15 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.63 (d, J = 8.96 Hz, 1H, NH-1), 8.50 (t, J = 4.82 Hz, 1H, NH-2), 8.41 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, J = 8.21 Hz, 3H, Ph-2, BzB-7), 8.10 (d, J = 8.81 Hz, 1H, BzA-5), 7.72 (m, 2H, BzA-4, BzB-5), 7.60 (d, J = 8.79 Hz, 1H, BzB-4), 7.49 (t, J = 6.21 Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, J = 8.19 Hz, 2H, Ph-3), 5.70 (dd, J = 8.97, 1.42 Hz, 1H, β Man-1), 5.34 (dd, J = 10.14, 3.43 Hz, 1H, β Man-3), 5.21 (dd, J = 3.45, 1.37 Hz, 1H, β Man-2), 5.04 (t, J = 9.98 Hz, 1H, β Man-4), 4.22 (d, J = 6.18 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 4.16 (dd, J = 12.16, 4.73 Hz, 1H, β Man-6'), 4.01 (ddd, J = 9.98, 4.71, 2.45 Hz, 1H, β Man-5), 3.98 (dd, J = 12.27, 2.46 Hz, 1H, β Man-6), 3.48 (q, J = 6.90 Hz, 2H, β Ala-a), 2.53 (m, 2H, β Ala-b), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 1.91 (s, 3H, COCH₃), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). $^{13}\text{C-NMR}$ [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 170.61 (CONH), 170.22 (COCH₃), 170.04 (COCH₃), 169.55 (COCH₃), 169.47 (COCH₃), 166.74 (CONH- β Ala-b), 155.85 (CO-Boc), 142.51 (C, Ph-4), 128.25 (C, Ph-1), 127.48 (2 \times CH, Ph-3), 126.65 (2 \times CH, Ph-2), 121.19 (3 \times CH, BzA-5, BzA-4, BzB-5), 110.07 (CH, BzB-4), 77.94 (C, Boc), 75.93 (CH, β Man-1), 72.58 (CH, β Man-5), 70.86 (CH, β Man-3), 69.26 (CH, β Man-2), 65.29 (CH, β Man-4), 62.10 (CH₂, β Man-6), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 35.71 (CH₂, β Ala-a), 34.95 (CH₂, β Ala-b), 28.26 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI⁺, (m/z)]: calc para C₄₄H₅₀N₇O₁₃ [M+H]⁺ = 884.3461, encontrado: 884.3468; calc para C₄₄H₄₉N₇O₁₃Na [M+Na]⁺ = 906.3286, encontrado: 906.3294. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3420, 2978, 2934, 1752, 1687, 1640, 1531, 1446, 1368, 1230, 1167, 1103, 1055, 960, 851, 746, 598, 559.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- α,β -D-Man(AcO)₄-¹³C₆ (22e**)**

Según el procedimiento general, a partir de **17** (107 mg, 0.19 mmol) y **20e** (82 mg, 0.23 mmol), se obtiene **22e** como un sólido amarillo (103 mg, 0.12 mmol, 61%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt → AcOEt/MeOH 9:1). La mezcla de anómeros α/β está en proporción 1/6.5 medida por ¹H-RMN. Se describe la caracterización del producto mayoritario (β) por RMN.

R_f = 0.57 (AcOEt/MeOH 9:1). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 13.15 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.63 (d, J = 8.96 Hz, 1H, NH-1), 8.50 (t, J = 4.82 Hz, 1H, NH-2), 8.41 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, J = 8.21 Hz, 3H, Ph-2, BzB-7), 8.10 (d, J = 8.81 Hz, 1H, BzA-5), 7.72 (m, 2H, BzA-4, BzB-5), 7.60 (d, J = 8.79 Hz, 1H, BzB-4), 7.49 (t, J = 6.21 Hz, 1H, NH-Boc), 7.44 (d, J = 8.19 Hz, 2H, Ph-3), 5.70 (dd, J = 15.3, 8.97 Hz, 1H, β Man-1), 5.34 (dd, J = 14.4, 10.14 Hz, 1H, β Man-3), 5.21 (dd, J = 14.8, 3.45 Hz, 1H, β Man-2), 5.04 (dt, J = 14.5, 9.98 Hz, 1H, β Man-4), 4.22 (d, J = 6.18 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 4.16 (m, 1H, β Man-6'), 4.01 (ddd, J = 9.98, 4.71, 2.45 Hz, 1H, β Man-5), 3.98 (m, 1H, β Man-6), 3.48 (q, J = 6.90 Hz, 2H, β Ala-a), 2.53 (m, 2H, β Ala-b), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 1.91 (s, 3H, COCH₃), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 75.93 (d, J = 40.9 Hz, CH, β Man-1), 72.58 (t, J = 43.0 Hz, CH, β Man-5), 70.86 (t, J = 40.3 Hz, CH, β Man-3), 69.26 (t, J = 40.8 Hz, CH, β Man-2), 65.29 (t, J = 42.1 Hz, CH, β Man-4), 62.10 (d, J = 45.0 Hz, CH₂, β Man-6). **HRMS** [ESI⁺, (m/z)]: calc para C₃₈¹³C₆H₅₀N₇O₁₃ [M+H]⁺ = 890.3662, encontrado: 890.3693; calc para C₃₈¹³C₆H₄₉N₇O₁₃Na [M+Na]⁺ = 912.3487, encontrado: 912.3501. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3407, 2978, 2936, 1752, 1686, 1641, 1535, 1445, 1368, 1230, 1167, 1103, 1055, 960, 851, 746, 599, 558.

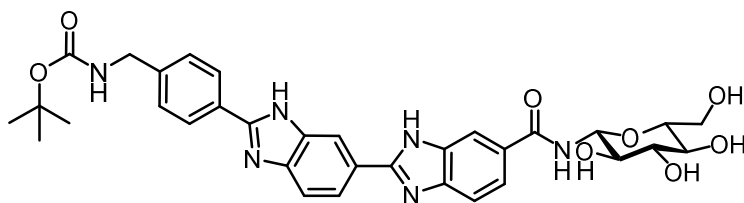
Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala-Cy (22f)

Según el procedimiento general, a partir de **17** (100 mg, 0.18 mmol) y ciclohexilamina (41 μ l mg, 0.36 mmol), se obtiene **22f** como un sólido amarillo (76 mg, 0.12 mmol, 67%) tras purificación por cromatografía en columna (AcOEt \rightarrow AcOEt/MeOH 9:1).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.24 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.49 (t, J = 5.30 Hz, 1H, NH-2), 8.43 (s, 1H, BzA-7), 8.19 (d, J = 8.13 Hz, 2H, Ph-2), 8.11 (d, J = 8.70 Hz, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.79 (m, 1H, NH-1), 7.72 (d, J = 8.29 Hz, 1H, BzB-5, BzA-4), 7.50 (m, 2H, BzB-4, NH-Boc), 7.43 (d, J = 8.09 Hz, 2H, Ph-3), 4.22 (d, J = 6.19 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.55 (tdt, J = 11.03, 7.20, 3.40 Hz, 1H, Cy-1), 3.48 (q, J = 6.50 Hz, 2H, β Ala-a), 2.38 (t, J = 7.24 Hz, 2H, β Ala-b), 1.73 (m, 2H, Cy-2'), 1.67 (m, 2H, Cy-3'), 1.54 (m, 1H, Cy-4'), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc), 1.24 (m, 2H, Cy-3), 1.13 (m, 2H, Cy-2), 1.10 (m, 1H, Cy-4). **$^{13}\text{C-NMR}$** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 169.40 (CONH), 166.68 (CONH- β Ala-b), 155.86 (CO-Boc), 142.48 (C, Ph-4), 128.29 (C, Ph-1), 127.46 (2 \times CH, Ph-3), 126.68 (2 \times CH, Ph-2), 121.20 (2 \times CH, BzA-4, BzB-5), 77.93 (C, Boc), 47.33 (CH, Cy-1), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 36.32 (CH₂, β Ala-a), 35.58 (CH₂, β Ala-b), 32.50 (2 \times CH₂, Cy-2), 28.25 (3 \times CH₃), 25.24 (CH, Cy-4), 24.60 (2 \times CH₂, Cy-3). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₆H₄₂N₇O₄ [M+H]⁺ = 636,3293 encontrado: 636.3273. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3417, 2930, 2855, 1689, 1634, 1543, 1448, 1384, 1367, 1308, 1251, 1168, 1102, 1049, 824, 743.

7.6.7. Procedimiento general para la desacetilación de grupos hidroxilo

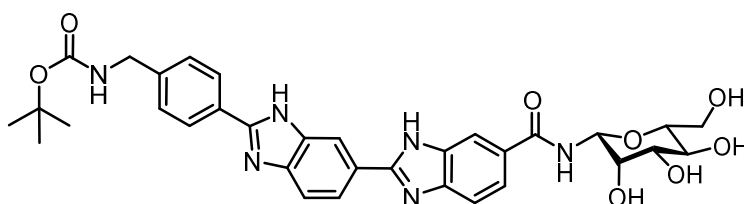
Se disuelve el correspondiente derivado boc-bis(benzimidazol)-Carbohidrato(AcO)₄ (**21a - c**) (1 equiv.) o boc-bis(benzimidazol)- β -Ala-Carbohidrato(AcO)₄ (**22a - e**) en la menor cantidad posible de metanol. Se añade poco a poco metóxido sódico (8 equiv.) disuelto en la menor cantidad posible de metanol y se agita durante 45 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añade resina de intercambio iónico hasta pH \approx 7. El precipitado que aparece se filtra y se lava con éter etílico.

Boc-bis(benzimidazol)- β -D-Glc(OH)₄ (23a)

Según el procedimiento general, a partir de **21a** (180 mg, 0.22 mmol) se obtiene **23a** como un sólido

amarillo pálido (60 mg, 0.09 mmol, 42%). Se obtiene anómero β puro por precipitación.

$[\alpha]_D^{25} = -91.5$ ($c = 1.0$, DMSO). **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.33 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.98 (t, $J = 9.89$ Hz, 1H, NH-1), 8.49 (s, 1H, BzA-7), 8.29 (s, 1H, BzB-7), 8.18 (d, $J = 8.01$ Hz, 2H, Ph-2), 8.14 (d, $J = 8.65$ Hz, 1H, BzA-5), 7.97 (d, $J = 8.50$ Hz, 1H, BzB-5), 7.88 (d, $J = 9.06$ Hz, 1H, BzA-4), 7.77 (d, $J = 8.85$ Hz, 1H, BzB-4), 7.51 (t, $J = 6.52$ Hz, 1H, NH-Boc), 7.48 (d, $J = 8.68$ Hz, 2H, Ph-3), 5.02 (t, $J = 8.88$ Hz, 1H, β Glc-1), 4.24 (d, $J = 6.04$ Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.70 (d, $J = 11.48$ Hz, 1H, β Glc-6'), 3.46 (dd, $J = 11.93$ 5.51 Hz, 1H, β Glc-6), 3.93 (t, $J = 8.26$ Hz, 1H β Glc-2), 3.27 (t, $J = 8.72$ Hz, 1H, β Glc-3), 3.20 (m, 1H, β Glc-5), 3.13 (t, $J = 9.13$, 1H, β Glc-4), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 155.87 (CO-Boc), 127.60 (2 \times CH, Ph-3), 127.03 (2 \times CH, Ph-2), 80.49 (CH, β Glc-1), 78.81 (CH, β Glc-5), 78.00 (CH, β Glc-3), 77.68 (C, Boc), 72.09 (CH, β Glc-2), 70.11 (CH, β Glc-4), 61.03 (CH₂, β Glc-6), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 28.25 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z): calc para C₃₃H₃₇N₆O₈ [M+H]⁺ = 645.2667, encontrado: 645.2655; calc para C₃₃H₃₆N₆O₈Na [M+Na]⁺ = 667.2492, encontrado: 667.2471. **IR** [ν (cm⁻¹): 3400, 2978, 2930, 1659, 1575, 1541, 1453, 1394, 1368, 1297, 1253, 1165, 1077, 1043, 850, 767, 559.

Boc-bis(benzimidazol)- β -D-Man(OH)₄ (23b)

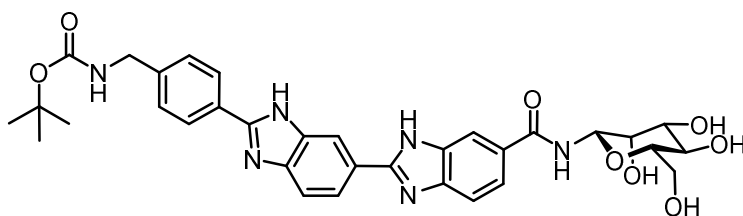
Según el procedimiento general, a partir de **21b** (200 mg, 0.25 mmol) se obtiene **23b** como un sólido amarillo pálido (74 mg, 0.12

mmol, 47%). Se obtiene anómero β puro por precipitación.

$[\alpha]_D^{25} = -79.4$ ($c = 1.0$, DMSO). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.29 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.43 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (m, 3H, BzB-7, Ph-2), 8.11 (d, $J = 8.54$ Hz, 1H, BzA-5), 7.78 (d, $J = 8.47$ Hz, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.68 (d, $J = 8.44$ Hz, 1H, BzB-4), 7.49 (t, $J = 6.12$ Hz, 1H, NH-Boc), 7.45 (d, $J = 8.01$ Hz, 2H, Ph-3), 5.29 (d, $J = 8.84$ Hz, 1H, β Man-1), 4.23 (d, $J = 6.12$ Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.75 (d, $J = 3.10$ Hz, 1H, β Man-2), 3.72 (d, $J = 11.12$

Hz, 1H, β Man-6'), 3.45 (m, 2H, β Man-6, β Man-3), 3.39 (t, J = 9.30 Hz, 1H, β Man-4), 3.18 (m, 1H, β Man-5), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 165.86 (CONH), 155.86 (CO-Boc), 142.76 (C, Ph-4), 127.52 (2 \times CH, Ph-3), 126.75 (2 \times CH, Ph-2), 121.83 (CH, BzB-5), 1221.58 (CH, BzA-5), 79.21 (CH, β Man-5), 78.21 (CH, β Man-1), 77.96 (C, Boc), 74.00 (CH, β Man-3), 70.77 (CH, β Man-2), 66.83 (CH, β Man-4), 61.30 (CH₂, β Man-6), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 28.26 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₃H₃₇N₆O₈ [M+H]⁺ = 645.2667, encontrado: 645.2660; calc para C₃₃H₃₆N₆O₈Na [M+Na]⁺ = 667.2492, encontrado: 667.2501. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3414, 2977, 2929, 1656, 1578, 1521, 1448, 1393, 1367, 1290, 1252, 1163, 1075, 1028, 980, 959, 936, 850, 774, 559.

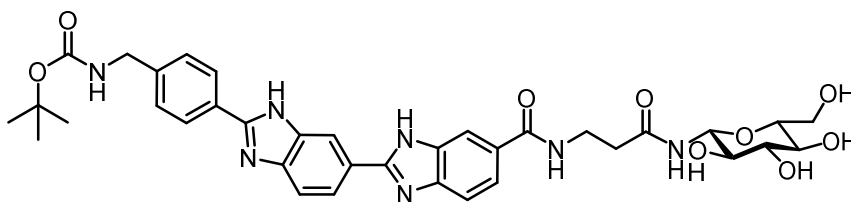
Boc-bis(benzimidazol)- β -L-Man(OH)₄ (**23c**)



Según el procedimiento general, a partir de **21c** (160 mg, 0.20 mmol) se obtiene **23c** como un sólido amarillo pálido (64 mg, 0.10 mmol,

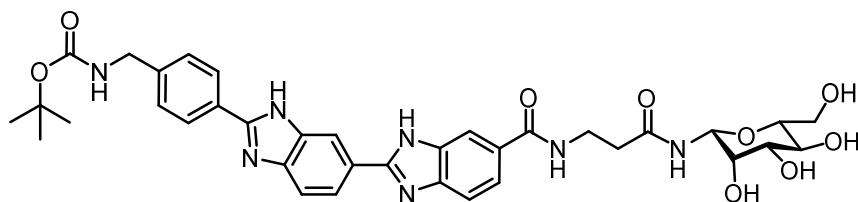
51%). Se obtiene anómero β puro por precipitación.

[α]_D²⁵ = +83.1 (c = 1.0, DMSO). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 13.29 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.43 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (m, 3H, BzB-7, Ph-2), 8.11 (d, J = 8.54 Hz, 1H, BzA-5), 7.78 (d, J = 8.47 Hz, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.68 (d, J = 8.44 Hz, 1H, BzB-4), 7.49 (t, J = 6.12 Hz, 1H, NH-Boc), 7.45 (d, J = 8.01 Hz, 2H, Ph-3), 5.29 (d, J = 8.84 Hz, 1H, β Man-1), 4.23 (d, J = 6.12 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.75 (d, J = 3.10 Hz, 1H, β Man-2), 3.72 (d, J = 11.12 Hz, 1H, β Man-6'), 3.45 (m, 2H, β Man-6, β Man-3), 3.39 (t, J = 9.30 Hz, 1H, β Man-4), 3.18 (m, 1H, β Man-5), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 165.86 (CONH), 155.86 (CO-Boc), 142.76 (C, Ph-4), 127.52 (2 \times CH, Ph-3), 126.75 (2 \times CH, Ph-2), 121.83 (CH, BzB-5), 1221.58 (CH, BzA-5), 79.21 (CH, β Man-5), 78.21 (CH, β Man-1), 77.96 (C, Boc), 74.00 (CH, β Man-3), 70.77 (CH, β Man-2), 66.83 (CH, β Man-4), 61.30 (CH₂, β Man-6), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 28.26 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₃H₃₇N₆O₈ [M+H]⁺ = 645.2667, encontrado: 645.2671; calc para C₃₃H₃₆N₆O₈Na [M+Na]⁺ = 667.2492, encontrado: 667.2487. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3421, 2977, 2925, 1632, 1524, 1446, 1393, 1367, 1291, 1252, 1164, 1075, 852, 774, 597.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glc(OH)₄ (24a)

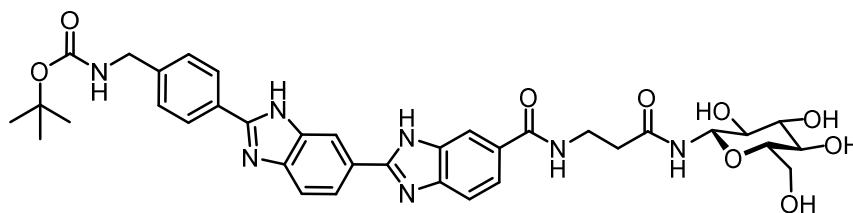
Según el procedimiento general, a partir de **22a** (80 mg, 0.09 mmol) se obtiene **24a** como un sólido amarillo pálido (32 mg, 0.04 mmol, 49%). Se obtiene anómero β puro por precipitación.

$[\alpha]_D^{25} = -33.9$ ($c = 1.0$, DMSO). **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.12 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.47 (m, 2H, NH-1, NH-2), 8.40 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, $J = 7.98$ Hz, 2H, Ph-2), 8.08 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.71 (m, 2H, BzA-4, BzB-5), 7.60 (d, $J = 8.51$ Hz, 1H, BzB-4), 7.49 (t, $J = 6.31$ Hz, 1H, NH-Boc), 7.42 (d, $J = 7.98$ Hz, 2H, Ph-3), 4.99 (d, $J = 4.63$ Hz, 1H, OH-6), 4.91 (sa, 3H, OH-2, OH-3, OH-4), 4.75 (t, $J = 9.04$ Hz, 1H, β Glc-1), 4.22 (d, $J = 6.14$ Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.66 (d, $J = 11.58$ Hz, 1H, β Glc-6'), 3.51 (q, $J = 6.95$ Hz, 2H, β Ala-a), 3.43 (dd, $J = 11.84, 5.08$ Hz, 1H, β Glc-6), 3.20 (td, $J = 8.71, 3.20$ Hz, 1H, β Glc-5), 3.08 (m, 3H, β Glc-4, β Glc-3, β Glc-2), 4.20 (m, 2H, β Ala-b), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 171.00 (CONH), 166.86 (CONH), 155.85 (CO-Boc), 142.25 (C, Ph-4), 128.19 (C, Ph-1), 127.42 (2 \times CH, Ph-3), 126.63 (2 \times CH, Ph-2), 121.11 (2 \times CH, BzA-5, BzB-5), 79.42 (CH, β Glc-1), 78.60 (CH, β Glc-4), 77.92 (C, Boc), 77.52 (CH, β Glc-5), 72.50 (CH, β Glc-3), 69.96 (CH, β Glc-2), 60.89 (CH₂, β Glc-6), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 35.88 (CH₂, β Ala-a), 35.51 (CH₂, β Ala-b), 28.26 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₆H₄₂N₇O₉ [$M+H$]⁺ = 716.3039, encontrado: 716.3054; calc para C₃₆H₄₁N₇O₉Na [$M+Na$]⁺ = 738.2863, encontrado: 738.2875. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3413, 2977, 2926, 1676, 1632, 1542, 1444, 1392, 1367, 1291, 1252, 1164, 1077, 1044, 823, 577.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man(OH)₄ (24b**)**

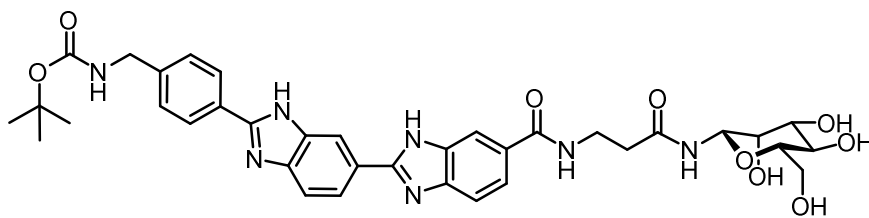
Según el procedimiento general, a partir de **22b** (90 mg, 0.10 mmol) se obtiene **24b** como un sólido amarillo pálido (32 mg, 0.04 mmol, 44%). Se obtiene anómero β puro por precipitación.

$[\alpha]_D^{25} = -41.8$ ($c = 1.0$, DMSO). **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.46 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.54 (t, $J = 5.53$ Hz, 1H, NH-2), 8.46 (s, 1H, BzA-7), 8.19 (m, 3H, NH-1, Ph-2), 8.14 (s, 1H, BzB-7), 8.12 (d, $J = 8.47$ Hz, 1H, BzA-5), 7.81 (m, 2H, BzA-4, BzB-5), 7.69 (d, $J = 8.44$ Hz, 1H BzB-4), 7.50 (t, $J = 6.24$ Hz, 1H NH-Boc), 7.46 (d, $J = 7.94$ Hz, 2H, Ph-3), 5.08 (d, $J = 9.90$ Hz, 1H, β Man-1), 4.23 (d, $J = 6.19$ Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.68 (dd, $J = 11.80$, 2.10 Hz, 1H, β Man-6'), 3.57 (d, $J = 3.02$ Hz, 1H, β Man-2), 3.50 (q, $J = 6.80$ Hz, 2H, β Ala-a), 3.42 (dd, $J = 12.04$, 6.35 Hz, 1H, β Man-6), 3.37 (m, 1H, β Man-3), 3.32 (t, $J = 9.22$ Hz, 1H, β Man-4), 3.08 (ddd, $J = 8.67$, 6.01, 2.11 Hz, 1H, β Man-5), 2.52 (m, 2H, β Ala-b), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 170.43 (CONH), 155.86 (CO-Boc), 127.56 (2 \times CH, Ph-3), 126.90 (2 \times CH, Ph-2), 79.19 (CH, β Man-5), 77.97 (C, Boc), 77.35 (CH, β Man-1), 74.02 (CH, β Man-3), 70.72 (β Man-2), 66.79 (CH, β Man-4), 61.36 (CH₂, β Man-6), 43.33 (CH₂, CH₂NHBoc), 36.07 (CH₂, β Ala-a), 35.12 (CH₂, β Ala-b), 28.24 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₆H₄₂N₇O₉ [M+H]⁺ = 716.3039, encontrado: 716.3014; calc para C₃₆H₄₁N₇O₉Na [M+Na]⁺ = 738.2863, encontrado: 738.2817. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3413, 2978, 2929, 1641, 1535, 1449, 1393, 1368, 1312, 1082, 852, 675, 559, 479.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Glc(OH)₄ (24c)

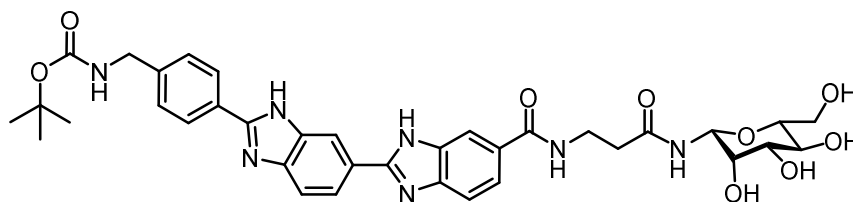
Según el procedimiento general, a partir de **22c** (110 mg, 0.12 mmol) se obtiene **24c** como un sólido amarillo pálido (38 mg, 0.05 mmol, 43%). Se obtiene anómero β puro por precipitación.

$[\alpha]_D^{25} = +35.2$ ($c = 1.0$, DMSO). **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.12 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.47 (m, 2H, NH-1, NH-2), 8.40 (s, 1H, BzA-7), 8.17 (d, $J = 7.98$ Hz, 2H, Ph-2), 8.08 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.71 (m, 2H, BzA-4, BzB-5), 7.60 (d, $J = 8.51$ Hz, 1H, BzB-4), 7.49 (t, $J = 6.31$ Hz, 1H, NH-Boc), 7.42 (d, $J = 7.98$ Hz, 2H, Ph-3), 4.99 (d, $J = 4.63$ Hz, 1H, OH-6), 4.91 (sa, 3H, OH-2, OH-3, OH-4), 4.75 (t, $J = 9.04$ Hz, 1H, β Glc-1), 4.22 (d, $J = 6.14$ Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.66 (d, $J = 11.58$ Hz, 1H, β Glc-6'), 3.51 (q, $J = 6.95$ Hz, 2H, β Ala-a), 3.43 (dd, $J = 11.84, 5.08$ Hz, 1H, β Glc-6), 3.20 (td, $J = 8.71, 3.20$ Hz, 1H, β Glc-5), 3.08 (m, 3H, β Glc-4, β Glc-3, β Glc-2), 4.20 (m, 2H, β Ala-b), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 171.00 (CONH), 166.86 (CONH), 155.85 (CO-Boc), 142.25 (C, Ph-4), 128.19 (C, Ph-1), 127.42 (2 \times CH, Ph-3), 126.63 (2 \times CH, Ph-2), 121.11 (2 \times CH, BzA-5, BzB-5), 79.42 (CH, β Glc-1), 78.60 (CH, β Glc-4), 77.92 (C, Boc), 77.52 (CH, β Glc-5), 72.50 (CH, β Glc-3), 69.96 (CH, β Glc-2), 60.89 (CH₂, β Glc-6), 43.24 (CH₂, CH₂NHBoc), 35.88 (CH₂, β Ala-a), 35.51 (CH₂, β Ala-b), 28.26 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI⁺, (m/z)]: calc para C₃₆H₄₂N₇O₉ [M+H]⁺ = 716.3039, encontrado: 716.3023; calc para C₃₆H₄₁N₇O₉Na [M+Na]⁺ = 738.2863, encontrado: 738.2840. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3412, 2977, 2929, 1674, 1642, 1539, 1450, 1368, 1309, 1251, 1165, 1079, 1044, 852, 559.

Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Man(OH)₄ (24d**)**

Según el procedimiento general, a partir de **22d** (150 mg, 0.17 mmol) se obtiene **24d** como un sólido amarillo pálido (56 mg, 0.08 mmol, 46%). Se obtiene anómero β puro por precipitación.

$[\alpha]_D^{25} = +43.5$ ($c = 1.0$, DMSO). **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.46 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.54 (t, $J = 5.53$ Hz, 1H, NH-2), 8.46 (s, 1H, BzA-7), 8.19 (m, 3H, NH-1, Ph-2), 8.14 (s, 1H, BzB-7), 8.12 (d, $J = 8.47$ Hz, 1H, BzA-5), 7.81 (m, 2H, BzA-4, BzB-5), 7.69 (d, $J = 8.44$ Hz, 1H BzB-4), 7.50 (t, $J = 6.24$ Hz, 1H NH-Boc), 7.46 (d, $J = 7.94$ Hz, 2H, Ph-3), 5.08 (d, $J = 9.90$ Hz, 1H, β Man-1), 4.23 (d, $J = 6.19$ Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.68 (dd, $J = 11.80$, 2.10 Hz, 1H, β Man-6'), 3.57 (d, $J = 3.02$ Hz, 1H, β Man-2), 3.50 (q, $J = 6.80$ Hz, 2H, β Ala-a), 3.42 (dd, $J = 12.04$, 6.35 Hz, 1H, β Man-6), 3.37 (m, 1H, β Man-3), 3.32 (t, $J = 9.22$ Hz, 1H, β Man-4), 3.08 (ddd, $J = 8.67$, 6.01, 2.11 Hz, 1H, β Man-5), 2.52 (m, 2H, β Ala-b), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 170.43 (CONH), 155.86 (CO-Boc), 127.56 (2 \times CH, Ph-3), 126.90 (2 \times CH, Ph-2), 79.19 (CH, β Man-5), 77.97 (C, Boc), 77.35 (CH, β Man-1), 74.02 (CH, β Man-3), 70.72 (β Man-2), 66.79 (CH, β Man-4), 61.36 (CH₂, β Man-6), 43.33 (CH₂, CH₂NHBoc), 36.07 (CH₂, β Ala-a), 35.12 (CH₂, β Ala-b), 28.24 (3 \times CH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z): calc para C₃₆H₄₂N₇O₉ [M+H]⁺ = 716.3039, encontrado: 716.3061; calc para C₃₆H₄₁N₇O₉Na [M+Na]⁺ = 738.2863, encontrado: 738.2863. **IR** [ν (cm⁻¹): 3413, 2978, 2929, 1641, 1535, 1449, 1393, 1368, 1312, 1082, 852, 675, 559, 479.

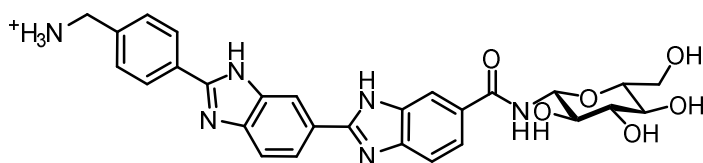
Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man(OH)₄-¹³C₆ (24e**)**

Según el procedimiento general, a partir de **22e** (86 mg, 0.097 mmol) se obtiene **24e** como un sólido amarillo pálido (29 mg, 0.041 mmol, 42%). Se obtiene anómero β puro por precipitación.

$[\alpha]_D^{25} = -40.2$ ($c = 1.0$, DMSO). **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.46 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.54 (t, $J = 5.53$ Hz, 1H, NH-2), 8.46 (s, 1H, BzA-7), 8.19 (m, 3H, NH-1, Ph-2), 8.14 (s, 1H, BzB-7), 8.12 (d, $J = 8.47$ Hz, 1H, BzA-5), 7.81 (m, 2H, BzA-4, BzB-5), 7.69 (d, $J = 8.44$ Hz, 1H BzB-4), 7.50 (t, $J = 6.24$ Hz, 1H NH-Boc), 7.46 (d, $J = 7.94$ Hz, 2H, Ph-3), 5.08 (dd, $J = 151, 9.90$ Hz, 1H, β Man-1), 4.23 (d, $J = 6.19$ Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.68 (dd, $J = 142, 11.80$ Hz, 1H, β Man-6'), 3.57 (m, 1H, β Man-2), 3.50 (q, $J = 6.80$ Hz, 2H, β Ala-a), 3.42 (m, 1H, β Man-6), 3.37 (m, 1H, β Man-3), 3.32 (m, 1H, β Man-4), 3.08 (ddd, $J = 141, 8.67, 6.01$ Hz, 1H, β Man-5), 2.52 (m, 2H, β Ala-b), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃Boc). **¹³C-NMR** [100 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 79.19 (t, $J = 42.3$ Hz, CH, β Man-5), 77.35 (d, $J = 41.6$ Hz, CH, β Man-1), 74.02 (t, $J = 38.9$ Hz, CH, β Man-3), 70.72 (t, $J = 40.5$ Hz, β Man-2), 66.79 (t, $J = 40.2$ Hz, CH, β Man-4), 61.36 (d, $J = 43.6$ Hz, CH₂, β Man-6). **HRMS** [ESI+, (m/z): calc para C₃₀¹³C₆H₄₂N₇O₉ [M+H]⁺ = 722.3240, encontrado: 722.3224; calc para C₃₀¹³C₆H₄₁N₇O₉Na [M+Na]⁺ = 744.3065, encontrado: 744.3026. **IR** [ν (cm⁻¹): 3413, 2978, 2929, 1641, 1535, 1449, 1393, 1368, 1312, 1082, 852, 675, 559, 479.

7.6.8. Procedimiento general para la eliminación del grupo protector *t*-butil carbamato: síntesis de los ligandos 1 - 10

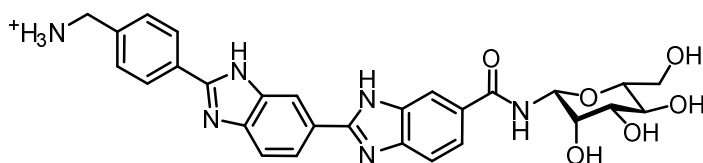
Se suspende el correspondiente derivado Boc-bis(benzimidazol)-Carbohidrato (**23a - d**) y Boc-bis(benzimidazol)- β -Ala-Carbohidrato (**24a - f**) en 10 - 15 ml de diclorometano. Se añade 1.5 ml de ácido trifluoroacético y se agita durante 15 minutos. Se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose el producto final deseado sin purificación adicional.

Bis(benzimidazol)-β-D-Glc(OH)₄ (2)

Según el procedimiento general, a partir de **23a** (44 mg, 0.07 mmol) se obtiene **2** como un sólido blanco (45 mg, 0.07

mmol, 100%). Se obtiene anómero β puro.

$[\alpha]_D^{25} = -77.6$ ($c = 1.0$, H_2O). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: 13.13 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.96 (d, $J = 8.88$ Hz, 1H, NH-1), 8.49 (s, 1H, BzA-7), 8.28 (m, 3H, Ph-2, BzB-7), 8.24 (sa, 3H, NH_3), 8.14 (dd, $J = 8.43, 1.65$ Hz, 1H, BzA-5), 7.94 (d, $J = 8.37$ Hz, 1H, BzB-5), 7.86 (d, $J = 8.46$ Hz, 1H, BzA-4), 7.74 (d, $J = 8.41$ Hz, 1H, BzB-4), 7.68 (d, $J = 8.08$ Hz, 2H, Ph-3), 5.02 (t, $J = 8.93$ Hz, 1H, β Glc-1), 4.16 (q, $J = 5.82$ Hz, 2H, CH_2NH_3), 3.70 (d, $J = 10.29$ Hz, 1H, β Glc-6), 3.46 (dd, $J = 11.98, 5.59$ Hz, 1H, β Glc-6), 3.40 (t, $J = 8.99$ Hz, 1H, β Glc-2), 3.27 (t, $J = 8.70$ Hz, 1H, β Glc-3), 3.21 (ddd, $J = 9.79, 5.53, 2.21$ Hz, 1H β Glc-5), 3.12 (t, $J = 9.17$ Hz, 1H, β Glc-4). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: 166.60 (CONH), 136.33 (C, Ph-4), 129.52 (2 \times CH, Ph-3), 129.39 (C, Ph-1), 127.02 (2 \times CH, Ph-2), 123.16 (CH, BzB-5), 122.03 (CH, BzA-5), 80.48 (CH, β Glc-1), 78.80 (CH, β Glc-5), 77.69 (CH, β Glc-3), 72.07 (CH, β Glc-2), 70.10 (CH, β Glc-4), 61.02 (CH_2 , β Glc-6), 42.04 (CH_2 , CH_2NH_3). **HRMS** [ESI+, (m/z): calc para $C_{28}H_{29}N_6O_6$ [$M+H$]⁺ = 545. 2143, encontrado: 545.2118. **IR** [ν (cm^{-1}): 3414, 2925, 1672, 1581, 1548, 1469, 1384, 1293, 1201, 1135, 1078, 1039, 890, 838, 799, 765, 722, 688, 598, 570, 516.

Bis(benzimidazol)-β-D-Man(OH)₄ (3)

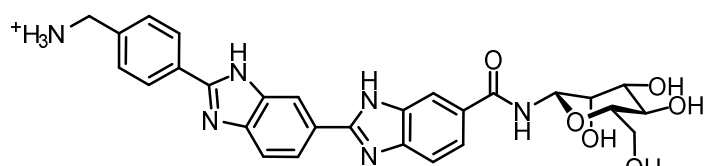
Según el procedimiento general, a partir de **23b** (60 mg, 0.09 mmol) se obtiene **3** como un sólido blanco (61 mg, 0.09

mmol, 100%). Se obtiene anómero β puro.

$[\alpha]_D^{25} = -120.8$ ($c = 1.0$, H_2O). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: 13.20 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.46 (s, 1H, BzA-7), 8.26 (d, $J = 8.07$ Hz, 2H, Ph-2), 8.24 (sa, 1H, NH), 8.22 (sa, 3H, NH_3), 8.17 (s, 1H, BzB-7), 8.12 (dd, $J = 8.42, 1.65$ Hz, 1H, BzA-5), 7.82 (m, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.71 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H, BzB-4), 7.66 (d, $J = 8.10$ Hz, 2H, Ph-3), 5.28 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H, β Man-1), 4.14 (q, $J = 5.90$ Hz, 2H, CH_2NH_3), 3.73 (dd, $J = 3.24$ Hz, 1H, β Man-2),

3.71 (dd, $J = 12.14$ Hz, 1H, β Man-6'), 3.43 (m, 2H, β Man-6, β Man-3), 3.36 (t, $J = 9.31$ Hz, 1H, β Man-4), 3.16 (ddd, $J = 8.81, 6.07, 2.21$, 1H, β Man-5). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 165.69 (CONH), 136.30 (C, Ph-4), 129.54 (2 \times CH, Ph-3), 129.47 (C, Ph-1), 127.01 (2 \times CH, Ph-2), 122.38 (BzB-5), 121.85 (BzA-5), 79.30 (CH, β Man-5), 78.30 (CH, β Man-1), 73.98 (CH, β Man-3), 70.76 (CH, β Man-2), 66.82 (CH, β Man-4), 61.31 (CH₂, β Man-6), 42.05 (CH₂, CH₂NH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₂₈H₂₉N₆O₆ [M+H]⁺ = 545.2143, encontrado: 545.2121. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3412, 3077, 2929, 1675, 1581, 1534, 1469, 1435, 1384, 1314, 1202, 1135, 1075, 891, 837, 798, 767, 722, 598, 571, 518.

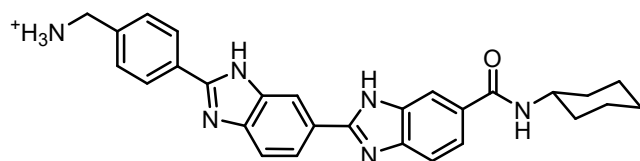
. Bis(benzimidazol)- β -L-Man(OH)₄ (4)



Según el procedimiento general, a partir de **23c** (49 mg, 0.08 mmol) se obtiene **4** como un sólido blanco (50 mg, 0.08

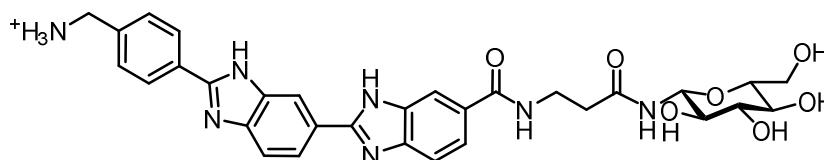
mmol, 100%). Se obtiene anómero β puro.

$[\alpha]_D^{25} = +115.3$ ($c = 1.0$, H₂O). **$^1\text{H-NMR}$** [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.20 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.46 (s, 1H, BzA-7), 8.26 (d, $J = 8.07$ Hz, 2H, Ph-2), 8.24 (sa, 1H, NH), 8.22 (sa, 3H, NH₃), 8.17 (s, 1H, BzB-7), 8.12 (dd, $J = 8.42, 1.65$ Hz, 1H, BzA-5), 7.82 (m, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.71 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H, BzB-4), 7.66 (d, $J = 8.10$ Hz, 2H, Ph-3), 5.28 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H, β Man-1), 4.14 (q, $J = 5.90$ Hz, 2H, CH₂NH₃), 3.73 (dd, $J = 3.24$ Hz, 1H, β Man-2), 3.71 (dd, $J = 12.14$ Hz, 1H, β Man-6'), 3.43 (m, 2H, β Man-6, β Man-3), 3.36 (t, $J = 9.31$ Hz, 1H, β Man-4), 3.16 (ddd, $J = 8.81, 6.07, 2.21$, 1H, β Man-5). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 165.69 (CONH), 136.30 (C, Ph-4), 129.54 (2 \times CH, Ph-3), 129.47 (C, Ph-1), 127.01 (2 \times CH, Ph-2), 122.38 (BzB-5), 121.85 (BzA-5), 79.30 (CH, β Man-5), 78.30 (CH, β Man-1), 73.98 (CH, β Man-3), 70.76 (CH, β Man-2), 66.82 (CH, β Man-4), 61.31 (CH₂, β Man-6), 42.05 (CH₂, CH₂NH₃). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₂₈H₂₉N₆O₆ [M+H]⁺ = 545.2143, encontrado: 545.2162. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3414, 2933, 1676, 1580, 1535, 1457, 1437, 1384, 1314, 1203, 1135, 1075, 978, 960, 893, 838, 799, 768, 722, 663, 599, 571, 518.

Bis(benzimidazol)-Cy (1)

Según el procedimiento general, a partir de **21d** (65 mg, 0.12 mmol) se obtiene **1** como un sólido blanco (66 mg, 0.12 mmol, 100%).

¹H-NMR [500 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 13.13 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.47 (s, 1H, BzA-7), 8.28 (d, J = 8.47 Hz, 2H, Ph-2), 8.25 (sa, 3H, NH₃), 8.18 (s, 1H, BzB-7), 8.13 (d, J = 8.46 Hz, 1H, BzA-5), 7.85 (m, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.70 (d, J = 8.51 Hz, 1H, BzB-4), 7.68 (d, J = 8.19 Hz, 2H, Ph-3), 4.16 (q, J = 5.89 Hz, 2H, CH₂NH₃), 3.18 (tdt, J = 11.11, 7.91, 3.82 Hz, 1H, Cy-1), 1.85 (m, 2H, Cy-2'), 1.76 (m, 2H, Cy-3'), 1.64 (m, 1H, Cy-4'), 1.36 (m, 2H, Cy-2), 1.33 (m, 2H, Cy-3), 1.16 (m, 1H, Cy-4). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 165.36 (CONH), 136.31 (C, Ph-4), 129.50 (2 \times CH, Ph-3), 129.42 (C, Ph-1), 127.00 (2 \times CH, Ph-2), 122.72 (CH, BzB-5), 121.93 (BzA-5), 48.48 (CH, Cy-1), 42.03 (CH₂, CH₂NH₃), 32.50 (2 \times CH₂, Cy-2), 25.31 (CH₂, Cy-4), 25.00 (2 \times CH₂, Cy-3). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₂₈H₂₉N₆O [$M+H$]⁺ = 465. 2397, encontrado: 465.2402. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3417, 3060, 2933, 2857, 2663, 1673, 1577, 1548, 1510, 1454, 1382, 1338, 1293, 1202, 1136, 1019, 976, 836, 798, 765, 722, 683, 597, 519.

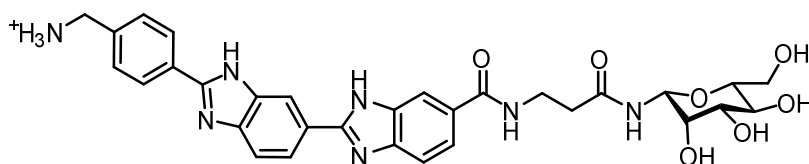
Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glc(OH)₄ (6)

Según el procedimiento general, a partir de **24a** (20 mg, 0.03 mmol) se obtiene **6** como un sólido blanco (20 mg, 0.03 mmol, 100%). Se obtiene anómero β puro.

$[\alpha]_D^{25}$ = -53.2 (c = 1.0, H₂O). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 13.24 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.59 (t, J = 5.63 Hz, 1H, NN-2), 8.48 (m, 3H, BzA-7, NH-1), 8.28 (d, J = 8.31 Hz, 2H, Ph-2), 8.24 (sa, 3H, NH₃), 8.15 (s, 1H, BzB-7), 8.13 (dd, J = 8.45, 1.64 Hz, 1H, BzA-5), 7.83 (m, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.71 (d, J = 8.60 Hz, 1H, BzB-4), 7.68 (d, J = 8.18 Hz, 2H, Ph-3), 4.76 (t, J = 9.07 Hz, 1H, β Glc-1), 4.16 (q, J = 5.86 Hz, 2H, CH₂NH₃), 3.66 (dd, J = 11.99, 2.04 Hz, 1H, β Glc-6'), 3.52 (q, J = 6.90 Hz, 2H, β Ala-a), 3.42 (dd, J = 11.86, 5.45 Hz, 1H, β Glc-6), 3.19 (t, J = 8.75 Hz, 1H, β Glc-3), 3.10 (m, 2H, β Glc-5, β Glc-2), 3.05 (t, J = 8.99

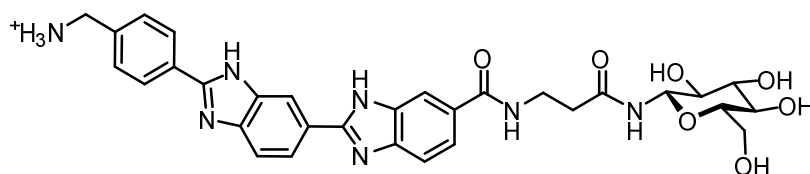
Hz, 1H, β Glc-4), 2.48 (m, 2H, β Ala-b). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 170.95 (CONH-1), 166.28 (CONH-2), 136.34 (C, Ph-4), 129.52 (2 \times CH, Ph-3), 129.38 (C, Ph-1), 127.05 (2 \times CH, Ph-2), 122.60 (CH, BzB-5), 121.98 (CH, BzA-5), 79.42 (CH, β Glc-1), 78.61 (CH, β Glc-5), 77.52 (CH, β Glc-3), 72.50 (CH, β Glc-2), 69.98 (CH, β Glc-4), 60.94 (CH₂, β Glc-6), 42.04 (CH₂, CH₂NH₃), 35.93 (CH₂, β Ala-a), 35.39 (CH₂, β Ala-b). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₁H₃₄N₇O₇ [M+H]⁺ = 616.2514, encontrado: 616.2500, calc para C₃₁H₃₃N₇O₇Na [M+Na]⁺ = 638.2334, encontrado: 638.2312. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3413, 2923, 1677, 1548, 1437, 1315, 1204, 1133, 1077, 837, 802, 722, 598.

Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man(OH)₄ (7)



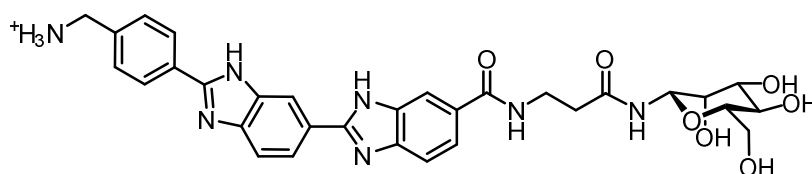
Según el procedimiento general, a partir de **24b** (20 mg, 0.03 mmol) se obtiene **7** como un sólido blanco (20 mg, 0.03 mmol, 100%). Se obtiene anómero β puro.

$[\alpha]_D^{25}$ = -82.2 (c = 1.0, H₂O). **$^1\text{H-NMR}$** [500 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 13.29 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.54 (t, J = 5.55 Hz, 1H, NH-2), 8.47 (s, 1H, BzA-7), 8.28 (d, J = 8.25 Hz, 2H, Ph-2), 8.26 (sa, 3H, NH₃), 8.19 (d, J = 8.25 Hz, 1H, NH-1), 8.14 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.83 (d, J = 8.49 Hz, 1H, BzA-4), 7.79 (d, J = 8.37 Hz, 1H, BzB-5), 7.68 (m, 3H, BzB-4, Ph-3), 5.08 (dd, J = 9.19, 1.27 Hz, 1H, β Man-1), 4.15 (q, J = 5.87 Hz, 2H, CH₂NH₃), 3.68 (dd, J = 11.78, 2.11 Hz, 1H, β Man-6'), 3.57 (dd, J = 2.96, 1.28 Hz, 1H, β Man-2), 3.50 (q, J = 7.04 Hz, 2H, β Ala-a), 3.42 (dd, J = 11.78, 6.10 Hz, 1H, β Man-6), 3.37 (dd, J = 9.21, 3.06 Hz, 1H, β Man-3), 3.33 (t, J = 9.15 Hz, 1H, β Man-4), 3.09 (ddd, J = 8.60, 6.07, 2.13 Hz, 1H, β Man-5), 2.52 (m, 2H, β Ala-b). **$^{13}\text{C-NMR}$** [125 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6]: 170.34 (CONH), 136.02 (C, Ph-4), 129.51 (C, Ph-1), 129.48 (2 \times CH, Ph-3), 126.95 (2 \times CH, Ph-2), 122.08 (CH, BzB-5), 121.74 (CH, BzA-5), 79.07 (CH, β Man-5), 77.73 (CH, β Man-1), 74.01 (CH, β Man-3), 70.72 (CH, β Man-2), 66.71 (CH, β Man-4), 61.30 (CH₂, β Man-6), 42.03 (CH₂, CH₂NH₃), 36.01 (CH₂, β Ala-a), 35.10 (CH₂, β Ala-b). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₁H₃₄N₇O₇ [M+H]⁺ = 616.2514, encontrado: 616.2483. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3375, 2926, 1676, 1573, 1544, 1453, 1382, 1314, 1203, 1135, 1076, 890, 837, 799, 765, 722, 599, 519.

Bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Glc(OH)₄ (8)

Según el procedimiento general, a partir de **24c** (28 mg, 0.04 mmol) se obtiene **8** como un sólido blanco (28 mg, 0.04 mmol, 100%). Se obtiene anómero β puro.

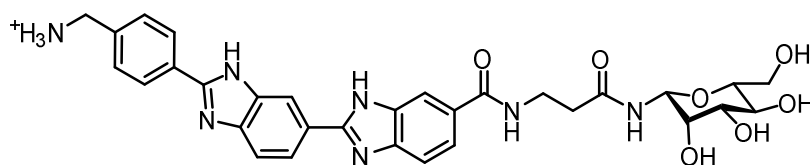
$[\alpha]_D^{25} = +55.8$ ($c = 1.0$, H_2O). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: 13.24 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.58 (t, $J = 5.63$ Hz, 1H, NN-2), 8.48 (m, 3H, BzA-7, NH-1), 8.28 (d, $J = 8.09$ Hz, 2H, Ph-2), 8.22 (sa, 3H, NH_3), 8.15 (s, 1H, BzB-7), 8.12 (dd, $J = 8.45, 1.65$ Hz, 1H, BzA-5), 7.82 (m, 2H, BzB-5, BzA-4), 7.70 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H, BzB-4), 7.67 (d, $J = 8.23$ Hz, 2H, Ph-3), 4.76 (t, $J = 9.06$ Hz, 1H, β Glc-1), 4.15 (q, $J = 5.87$ Hz, 2H, CH_2NH_3), 3.66 (dd, $J = 11.92, 2.03$ Hz, 1H, β Glc-6'), 3.52 (q, $J = 6.90$ Hz, 2H, β Ala-a), 3.42 (dd, $J = 11.85, 5.42$ Hz, 1H, β Glc-6), 3.19 (t, $J = 8.71$ Hz, 1H, β Glc-3), 3.10 (m, 2H, β Glc-5, β Glc-2), 3.05 (t, $J = 8.99$ Hz, 1H, β Glc-4), 2.48 (m, 2H, β Ala-b). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: 170.95 (CONH-1), 166.37 (CONH-2), 136.21 (C, Ph-4), 129.50 (2 \times CH, Ph-3), 129.38 (C, Ph-1), 126.97 (2 \times CH, Ph-2), 122.60 (CH, BzB-5), 121.98 (CH, BzA-5), 79.42 (CH, β Glc-1), 78.61 (CH, β Glc-5), 77.52 (CH, β Glc-3), 72.50 (CH, β Glc-2), 69.98 (CH, β Glc-4), 60.93 (CH_2 , β Glc-6), 42.05 (CH_2 , CH_2NH_3), 35.91 (CH_2 , β Ala-a), 35.41 (CH_2 , β Ala-b). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para $C_{31}H_{34}N_7O_7$ $[M+H]^+ = 616.2514$, encontrado: 616.2528. **IR** [ν (cm^{-1})]: 3401, 3075, 2923, 2854, 1673, 1572, 1548, 1457, 1380, 1315, 1202, 1134, 1078, 889, 836, 799, 722, 520.

Bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Man(OH)₄ (9)

Según el procedimiento general, a partir de **24d** (40 mg, 0.05 mmol) se obtiene **9** como un sólido blanco (41 mg, 0.05 mmol, 100%). Se obtiene anómero β puro.

$[\alpha]_D^{25} = +81.2$ ($c = 1.0$, H_2O). **1H -NMR** [500 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: 13.27 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.53 (t, $J = 5.65$ Hz, 1H, NH-2), 8.47 (s, 1H, BzA-7), 8.28 (d, $J = 8.21$ Hz, 2H, Ph-2), 8.25 (sa, 3H, NH_3), 8.19 (d, $J = 8.27$ Hz, 1H, NH-1), 8.15 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.82 (d, $J = 8.44$ Hz, 1H, BzA-4), 7.79 (d, $J = 8.36$ Hz, 1H, BzB-5), 7.67 (m, 3H, BzB-4, Ph-3), 5.08 (dd, $J = 9.18, 1.29$ Hz, 1H, β Man-1), 4.15 (q, $J = 5.88$ Hz, 2H, CH_2NH_3), 3.68 (dd, $J = 11.77, 2.09$ Hz, 1H, β Man-6'), 3.58 (dd, $J = 2.98, 1.27$ Hz, 1H, β Man-2), 3.50 (q, $J = 7.10$ Hz, 2H, β Ala-a), 3.42 (dd, $J = 11.80, 6.11$ Hz, 1H, β Man-6), 3.37 (dd, $J = 9.19, 3.05$ Hz, 1H, β Man-3), 3.32 (t, $J = 9.17$ Hz, 1H, β Man-4), 3.09 (ddd, $J = 8.61, 6.09, 2.11$ Hz, 1H, β Man-5), 2.52 (m, 2H, β Ala-b). **^{13}C -NMR** [125 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: 170.32 (CONH), 136.01 (C, Ph-4), 129.52 (C, Ph-1), 129.48 ($2\times CH$, Ph-3), 126.94 ($2\times CH$, Ph-2), 122.08 (CH, BzB-5), 121.74 (CH, BzA-5), 79.07 (CH, β Man-5), 77.74 (CH, β Man-1), 74.01 (CH, β Man-3), 70.72 (CH, β Man-2), 66.71 (CH, β Man-4), 61.30 (CH_2 , β Man-6), 42.02 (CH_2 , CH_2NH_3), 36.01 (CH_2 , β Ala-a), 35.11 (CH_2 , β Ala-b). **HRMS** [ESI+, (m/z): calc para $C_{31}H_{34}N_7O_7$ $[M+H]^+ = 616.2514$, encontrado: 616.2550 calc para $C_{31}H_{33}N_7O_7Na$ $[M+Na]^+ = 638.2334$, encontrado: 638.2363. **IR** [ν (cm^{-1}): 3385, 2924, 2854, 1675, 1576, 1544, 1456, 1383, 1315, 1202, 1136, 1076, 959, 891, 837, 799, 765, 722, 599, 518.

Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Man(OH) $_4$ - $^{13}C_6$ (**10**)

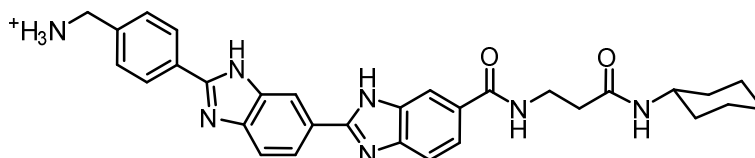


Según el procedimiento general, a partir de **24e** (25 mg, 0.034 mmol) se obtiene **10** como un sólido blanco (26 mg, 0.034 mmol, 100%). Se obtiene anómero β puro.

$[\alpha]_D^{25} = -80.2$ ($c = 1.0$, H_2O). **1H -NMR** [500 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: 13.29 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.54 (t, $J = 5.55$ Hz, 1H, NH-2), 8.47 (s, 1H, BzA-7), 8.28 (d, $J = 8.25$ Hz, 2H, Ph-2), 8.26 (sa, 3H, NH_3), 8.19 (d, $J = 8.25$ Hz, 1H, NH-1), 8.14 (m, 2H, BzB-7, BzA-5), 7.83 (d, $J = 8.49$ Hz, 1H, BzA-4), 7.79 (d, $J = 8.37$ Hz, 1H, BzB-5), 7.68 (m, 3H, BzB-4, Ph-3), 5.08 (dd, $J = 14.9, 9.19$ Hz, 1H, β Man-1), 4.15 (q, $J = 5.87$ Hz, 2H, CH_2NH_3), 3.68 (dd, $J = 14.5, 11.78$ Hz, 1H, β Man-6'), 3.57 (dd, $J = 14.3, 2.96$ Hz, 1H, β Man-2), 3.50 (q, $J = 7.04$ Hz, 2H, β Ala-a), 3.42 (m, 1H, β Man-6), 3.37 (m, 1H, β Man-3), 3.33 (m, 1H, β Man-4), 3.09 (m, 1H, β Man-5), 2.52 (m, 2H, β Ala-b). **^{13}C -NMR** [125 MHz, δ (ppm), $DMSO-d_6$]: (t, $J = 42.3$ Hz, CH, β Man-5), 77.73 (d, $J = 41.2$ Hz, CH, β Man-1), 74.01 (t, $J = 38.9$ Hz, CH, β Man-3), 70.72 (t, $J = 41.4$ Hz, CH, β Man-2), 66.71 (t, $J = 40.2$ Hz, CH, β Man-4), 61.30 (d, $J =$

43.7 Hz, CH₂, βMan-6). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₂₅¹³C₆H₃₄N₇O₇ [M+H]⁺ = 622.2716, encontrado: 622.2742. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3375, 2926, 1676, 1573, 1544, 1453, 1382, 1314, 1203, 1135, 1076, 890, 837, 799, 765, 722, 599, 519.

Bis(benzimidazol)-β-Ala-Cy (5)



Según el procedimiento general, a partir **22f** (36 mg, 0.06 mmol) se obtiene **5** como un sólido blanco (39 mg, 0.06 mmol, 100%).

¹H-NMR [500 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 13.34 (sa, 2H, NHBzA, NHBzB), 8.55 (t, *J* = 5.69 Hz, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, BzA-7), 8.28 (d, *J* = 8.12 Hz, 2H, Ph-2), 8.24 (sa, 3H, NH₃), 8.13 (m, 2H, BaA-5, BzB-7), 7.82 (d, *J* = 8.57 Hz, 1H, BzB-5), 7.79 (m, 2H, BzA-4, BzB-4), 7.67 (d, *J* = 8.12 Hz, 2H, Ph-3), 4.15 (q, *J* = 5.90 Hz, 2H, CH₂NH₃), 3.56 (tdt, *J* = 10.69, 6.82, 3.50 Hz, 1H, Cy-1), 3.49 (q, *J* = 6.82 Hz, 2H, βAla-a), 2.39 (t, *J* = 7.24 Hz, 2H, βAla-b), 1.73 (dd, *J* = 12.63, 3.85 Hz, 2H, Cy-2'), 1.67 (dt, *J* = 12.53, 3.49 Hz, 2H, Cy-3'), 1.55 (dq, *J* = 7.42, 3.86 Hz, 1H, Cy-4'), 1.24 (qd, *J* = 12.87, 5.83 Hz, 2H, Cy-3), 1.12 (m, 3H, Cy-2, Cy-4). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), DMSO-*d*₆]: 169.36 (2×CONH), 136.18 (C, Ph-4), 126.57 (C, Ph-1), 129.49 (2×CH, Ph-3), 126.95 (2×CH, Ph-2), 121.86 (CH, BzB-5), 121.53 (CH, BzA-5), 47.33 (CH, Cy-1), 42.04 (CH₂, βAla-a), 35.51 (CH₂, βAla-b), 32.50 (2×CH₂, Cy-2), 25.23 (CH₂, Cy-4), 24.59 (2×CH₂, Cy-3). **HRMS** [ESI+, (m/z)]: calc para C₃₁H₃₄N₇O₂ [M+H]⁺ = 536.2768, encontrado: 536.2796. **IR** [ν (cm⁻¹)]: 3386, 3075, 2934, 2857, 1675, 1641, 1571, 1550, 1452, 1382, 1313, 1202, 1136, 977, 960, 891, 836, 799, 765, 722, 599.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Solís, D.; Bovin, N. V.; Davis, A. P.; Jiménez-Barbero, J.; Romero, A.; Roy, R.; Smetana Jr, K.; Gabius, H.-J. *Biochim. Biophys. Acta*. **2015**, *1850*, 186-235.
- [2] Crick, F. *Nature*. **1970**, *227*, 561-563.
- [3] a) Perdew, G. H.; Heuvel, J. P.; Peters, J. M. *Regulation of Gene Expression*. **2007**, 215-238. b) Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342-7372.
- [4] a) Seo, J.; Lee, K. J. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *37*, 35-44. b) Nørregaard Jensen, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 33-41. c) Porter, K.; Medford, H. M.; McIntosh, C. M.; Marsh, S. A. *Life Sci.* **2012**, *90*, 89-98.
- [5] a) Slawson, C.; Hart, G. W. *Nat. Rev. Cancer*. **2011**, *11*, 678-684. b) Özcan, S.; Andrali, S. S.; Cantrell, J. E. L. *Biochim. Biophys. Acta*. **2010**, *1799*, 353-364.
- [6] Akimoto, Y.; Hart, G. W.; Wells, L.; Vosseller, K.; Yamamoto, K.; Munetomo, E.; Ohara-Imaizumi, M.; Nishiwaki, C.; Nagamatsu, S.; Hirano, H.; Kawakami, H. *Glycobiology*. **2007**, *17*, 127-140.
- [7] Rexach, J. E.; Clark, P. M.; Mason, D. E.; Neve, R. L.; Peters, E. C.; Hsieh-Wilson, L. C. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 253-261.
- [8] Watson, J. D.; Crick F. H. C. *Nature*. **1953**, *171*, 737-738.
- [9] a) Calladine, C. R. *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 343-352. b) Sarai, A.; Mazur, J.; Nussinov, R.; Jernigan, R. L. *Biochemistry*. **1988**, *27*, 8498-8502.
- [10] a) Stefl, R.; Wu H.; Ravindranathan S.; Sklenr V.; Feigon J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2004**, *101*, 177-1182. b) A. S. Maki, T. Kim, E. T. Kool, *Biochemistry*. **2004**, *43*, 1102-1110. c) D. M. Crothers, T. E. Haran, J. G. Nadeau, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7093-7096.
- [11] Strekowski, L.; Wilson, B. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **2007**, *623*, 3-13.
- [12] Rohs, R.; Jin, X.; West, S. M.; Joshi, R.; Honig, B.; Mann, R. S. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 233-269.
- [13] Hamilton, P. L.; Arya, D.P. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 134-143.
- [14] a) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720. b) Gabius, H. J.; Siebert, H. C.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Rudiger, H. *Chembiochem*. **2004**, *5*, 740-64. c) Gabius, H. J.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Romero, A.; Solís, D. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 298-313.

- [15] Vyas, N. K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 732-740.
- [16] a) Glickson, J. D.; Phillips, W. D.; Rupley, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4031–4035. b) Quijoch, F. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 287–315. c) Hsu, C.H., Park, S.; Mortenson, D. E.; Foley, B. L.; Wang, X.; Woods, R. J.; Case, D. A.; Powers, E. T; Wong, C. H.; Dyson, H. J.; Kelly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 7636-7648.
- [17] a) Quijoch, F.A. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1293-1306. b) Lemieux, R.U. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 373-380.
- [18] Nishio, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13873-13900.
- [19] a) Fernández-Alonso, M. d. C.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7379-7386. b) Vandenbussche, S.; Díaz, D.; Fernández-Alonso, M. C.; Pan, W.; Vincent, S. P.; Cuevas, G.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Bartik, K. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7570-7578.
- [20] a) Nishio, M.; Umezawa, Y.; Fantini, J.; Weiss, M. S.; Chakrabarti, P. *PCCP.* **2014**, *16*, 12648-12683. b) Jiménez-Moreno, E.; Jimenez-Oses, G.; Gomez, A. M.; Santana, A. G.; Corzana, F.; Bastida, A.; JimenezBarbero, J.; Asensio, J. L. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 6076-6085. c) Jiménez-Moreno, E.; Gómez, A. M.; Bastida, A.; Corzana, F.; Jiménez-Oses, G.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4344.
- [21] Prins, L. J.; Reinhoudt, D. N.; Timmerman, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2382-2426
- [22] Frank, H. S.; Wen, W. Y. *Discuss. Faraday Soc.* **1957**, *24*, 133-140.
- [23] a) Jeffrey, G. A.; Kim, H. S. *Carbohydr. Res.* **1978**, *14*, 207-216. b) Notelmeyer, M.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2710-2722. c) Steiner, T.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7123-7126.
- [24] a) Christofides, J. C.; Davies, D. B.; Martin, J. A.; Rathbone, E. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5738-5743. b) Christofides, J. C.; Davies, D. B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1987**, 97-102.
- [25] a) *Anthracycline and Anthracenedione-based Anticancer Agents*, Bioactive Molecules, ed J. W. Lown, Vol III Elsevier, Amsterdam, **1988** b) Lown, J.W. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 165-176.
- [26] a) Quigley, G.J.; Wang A. H.-J.; Ughetto, G.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1980**, *77*, 7204-7208. b) Frederick, C. A.; Williams,

- L. D.; Ughetto, G.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Rich, A.; Wang, A. H. J. *Biochemistry*. **1990**, *29*, 2538-2549.
- [27] Boger, D.L.; Teramoto, S.; Zhou, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7344-7356.
- [28] Bailly, C.; Qu, X.; Anizon, F.; Prudhomme, M.; Riou, J.-F.; Chaires, J. B. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 377-385.
- [29] Walker, S.; Landovitz, R.; Ding, W. D.; Ellestad, G. A.; Kahne, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1992**, *89*, 4608-4612.
- [30] Kahne, D. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 7-12
- [31] a) Uesugi, M.; Sugiura, Y. *Biochemistry*. **1993**, *32*, 4622-4627. b) Paloma, L. G.; Smith, J. A.; Chazin, W. J.; Nicolaou, K. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3697-3708.
- [32] Kalben, A.; Pal, S.; Andreotti, A.M.; Walker, S.; Gange, D.; Biswas, K.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8403-8420.
- [33] a) Ding, W.-D.; Ellestad, G.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6617-6620. b). Krishnamurthy, G.; Brenowitz, M. D.; Ellestad, G. A. *Biochemistry*. **1995**, *34*, 1001-1010.
- [34] a) Gao, X.; Mirau, P.; Patel, D. J. *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 259-279. b) Silva, D.J.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7962-7970. c) Katahira, R.; Yamashita, Y.; Ogawa, H.; Yoshida, M.; Katahira, M.; Kyogoku, Y. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 744-755.
- [35] a) Kumar, S.; Xue, L.; Arya, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7361-7375. b) Willis, A.; Arya, D. P. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 663-673.
- [36] a) Arya, D. P.; Coffee, R. L., Jr.; Willis, B.; Abramovitch, A. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5385-5395. b) Arya, D. P.; Coffee, R. L., Jr.; Charles, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11093-11094. c) Xi, H.; Arya, D. P. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 327-338.
- [37] Ranjan, N.; Andreasen, K. F.; Kumar, S.; Hyde-Volpe, D.; Arya, D. P. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9891-9903.
- [38] López de la Paz, M.; Ellis, G.; Pérez, M.; Perkins, J.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *5*, 840-855
- [39] Lopez de la Paz, M.; Gonzalez, C.; Vicent, C. *Chem. Commun.* **2000**, 411-412.
- [40] Muñoz, E. M.; López de la Paz, M.; Jiménez-Barbero, J.; Ellis, G.; Pérez, M.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1908-1914.

- [41] Vicente, V.; Martin, J.; Jiménez-Barbero, J.; Chiara, J. L.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4240-4251.
- [42] a) Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215-2235. b) Dervan, P. B.; Poulin-Kerstien, A. T.; Fechter, E. J.; Edelson, B. S. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *253*, 1-31.
- [43] a) Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983-7988. b) Greenberg, W. A.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 796-805. c) Melander, C.; Herman, D. M.; Dervan, P. B. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4487-4497. d) Heckel, A.; Dervan, P. B. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3353-3366.
- [44] Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1382-1391.
- [45] Hawkins, C. A.; Peláez de Clairac, R.; Dominey, R. N.; Baird, E. E.; White, S.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5235-5243.
- [46] a) Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature*. **1996**, *382*, 559-561. b) Trauger, J. W.; Dervan, P. B. *Methods in Enzymology* **2001**, *340*, 450-466.
- [47] a) Kielkopf, C. L.; Baird, E. E.; Dervan, P. D.; Rees, D. C. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 104-109. b) White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1998**, *391*, 468-471. c) Kielkopf, C. L.; White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C. *Science* **1998**, *282*, 111-115. d) Kielkopf, C. L.; Bremer, R. E.; White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 557-567.
- [48] Martin, J. N.; Muñoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jimenez-Barbero, J.; Cañada, J.; Vicent, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9518-9533.
- [49] Peñalver, P.; Abdelouahid, S.; Bosch, P.; Hunter, C. A.; Vicent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 2220-2231.
- [50] a) Souard, F.; Muñoz, E.; Peñalver, P.; Badía, C.; del Villar-Guerra, R.; Asensio, Juan L.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435-2442. b) Peñalver, P.; Marcelo, F.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4561-4570.
- [51] Blázquez-Sánchez, M. T.; Marcelo, F.; Fernández-Alonso, M. C.; Poveda, A.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 17640-17652.
- [52] Blázquez-Sánchez, M. T.; Marcelo, F.; Fernández-Alonso, M. d. C.; del Villar-Guerra, R.; Samadi, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6180-6193.

- [53] a) Taladriz-Sender, A.; Vicent, C. *Supramolecular Chem.* **2013**, *25*, 656- 664. b) Tesis doctoral *Glico-oligoamidas catiónicas para el estudio de la interacción carbohidrato-ADN*. Andrea Taladriz Sender. **2015**. Dirigida por la Dr. Cristina Vicent Laso
- [54] Haq, I.; Ladbury, J. E.; Chowdhry, B. Z.; Jenkins, T. C.; Chaires, J. B.; *J. Mol. Biol.* **1997**, *271*, 244-257.
- [55] a) Parkinson, J. A.; Barber, J.; Buckinham, B. A.; Douglas, K. T.; *Magnetic resonance in Chemistry.* **1992**, *30*, 1064-1069. b) Embrey, K. J.; Searle, M. S.; Craik, D. J.; *Eur. J. Biochem.* **1993**, *211*, 437-447.
- [56] Fede, A.; Billeter, M.; Leupin, W.; Wüthrich. K. *Structure.* **1993**, *1*, 177-186
- [57] Bazhulina, N. P.; Nikitin, A. M.; Rodin, S. A.; Surovaya, A. N.; Kravatsky, Y. V.; Pismensky, V. F.; Archipova, V. S.; Martin, R.; Gursky, G. V. *J. Biomol. Structure and Dynamics.* **2009**, *26*, 701-718.
- [58] Buurma, N. J.; Haq, I. *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 607-621.
- [59] Behrens, C.; Harrit, N.; Nielsen, P. E. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 1021-1027.
- [60] Bunkenborg, J.; Behrens, C.; Jacobsen, J. P. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 927-936.
- [61] Latt, S. A.; Wohlleb, J. C. *Chromosoma.* **1975**, *52*, 297-316.
- [62] Utsuno, K.; Maeda, Y.; Tsuboi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1363-1368.
- [63] Chaires, J. B.; Waring, M. J. *Methods in Enzymology.* **2001**, *340*, 68-98.
- [64]; Smulders, M. M. J.; Nieuwenhuizen, M. M. L.; Greef, T. F. A.; Van der Schoot, P.; Schenning, A. P. H. J.; Meijer, E. W. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 362-367.
- [65] Saeed, I.Q.; Buurma, N. J. Microcalorimetry of Biological Molecules: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1964, **2019**. Páginas 169-183.
- [66] Garbett, N.C.; Ragazzon, P. A.; Chaires, J. B. *Nature Protocols*, **2007**, *2*, 3166-3172.
- [67] Dršata, T.; Pérez, A.; Orozco, M.; Morozov, A. V.; Šponer, J.; Lankaš, F. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *91*, 707-721.
- [68] Fornander, L. H.; Wu, L.; Billeter, M.; Lincoln, P.; Norden, B.; *J. Phis. Chem B.* **2013**, *117*, 5820-5830.
- [69] Drobyshev, A. L.; Zasedatelev, A. S.; Yershov, G. M.; Mirzabekov, A. D. *Nucleic Acid Research.* **1999**, *27*, 4100-4105.

- [70] a) Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784-1788. b) Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890-918. c) Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108-6117. d) Di Micco, S.; Bassarello, C.; Bifulco, G.; Riccio, R.; Gómez-Paloma, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 224-228.
- [71] Dado, G. P.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1054-1062.
- [72] Harada, N. Nakanishi, K. *Circular Dichroic Spectroscopy*, **1983**. Elsevier.
- [73] Hare, D. H.; Wemmer, D. E.; Chou, S. Drobny, G. *J. Mol. Biol.* **1983**, *171*, 319-336.
- [74] Fontana, C.; *Biomol. NMR*. **2014**, *59*, 95-110.
- [75] Nestor, G.; Anderson, T.; Oscarson, S.; Gronenborn, A. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 6210-6216.
- [76] Jing, X.; Zhu, Q.; Xu, F.; Ren, X.; Li, D.; Yan, C. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 2597-2601.
- [77] Tandon, V.K.; Kumar, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4185-4187.
- [78] VanVliet, D. S.; Gillespie, P.; Scicinski, J. J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6741-6743.
- [79] Hegedüs, A.; Hell, Z.; Potor, A. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 3625-3630.
- [80] Wang, Z. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc. **2010**.
- [81] Singh, M.; Tandon, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 659-669.
- [82] Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Letters*. **1989**, *30*, 1927-1930.
- [83] Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews*. **2009**, *38*, 606-631.
- [84] Hikawa, H.; Imani, M.; Suzuki, H.; Yokoyama, Y.; Azumaya, I. *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 3768-3773.
- [85] Caddick, S.; Judd, D. B.; de K. Lewis, A. K.; Reich, M. T.; Williams, M. R. V. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 5417-5423.
- [86] a) Badia, C.; Souard, F.; Vicent, C. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10870-10881. b) Babiano Caballero, R.; Fuentes Mota, J.; Galbis Pérez, J. A. *Carbohydr. Res.* **1986**, *154*, 280-288. c) Shiozakia, M.; Mochizukia, T.; Hanzawab, H.; Haruyama, H. *Carbohydr. Res.* **1996**, *288*, 99-108.

- [87] Beckmann, H. S. G.; Wittmann, V. *Azides in Carbohydrate Chemistry*. **2009** Capítulo 16. John Wiley & Sons, Ltd.
- [88] Jans, A. C. H.; Gomez-Suarez, A.; Nolan, S. P.; Reek, J. N. H. *Chem Eur J*, **2013**, *19*, 14836-14839.
- [89] Reinhard, B.; Faillard, H. *Liebigs Ann Chem*. **1994**, *2*, 193-203.
- [90] Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's protective groups in organic synthesis*. **2006**.
- [91] Lading, M.; Leupin, W.; Meuwly, M.; Respondek, M, Wirz, J.; Zoete, V. *Helvetica chimica acta* **2005**, *88*, 53-67.
- [92] Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčiuk, D.; Vorlíčková, M. *Nucleic Acids Research*, **2009**, *37*, 1713–1725.
- [93] Lee, H. M.; Chan, D. S. H.; Yang, F.; Lam, H. Y.; Yan, S. C.; Che, C. M.; Ma, D. L.; Leung, C, H. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 4680–4682.

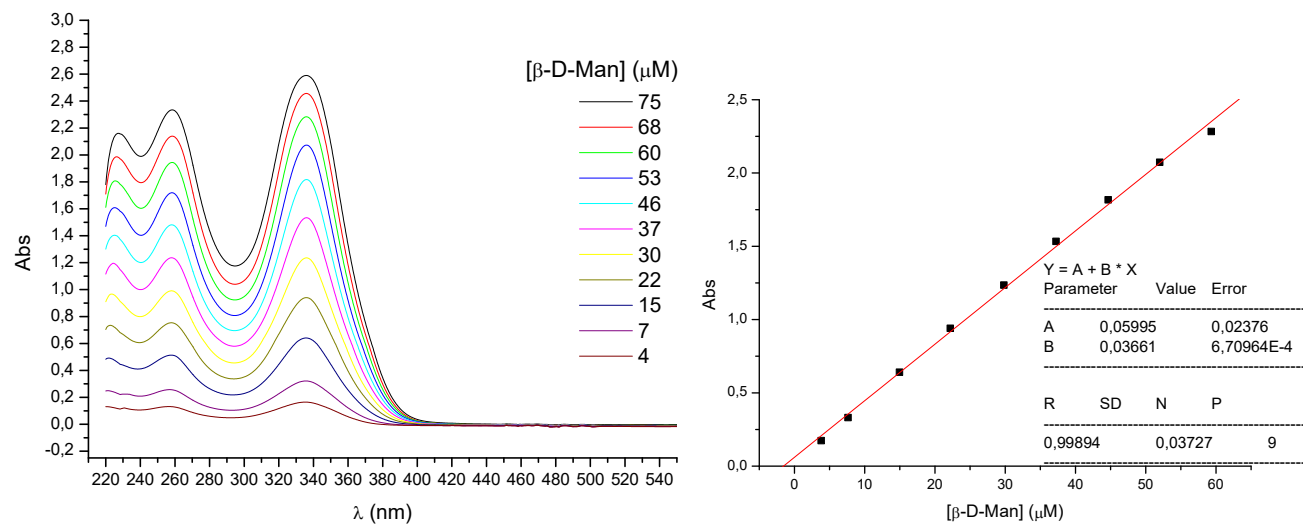
ANEXO

Anexo Capítulo 2

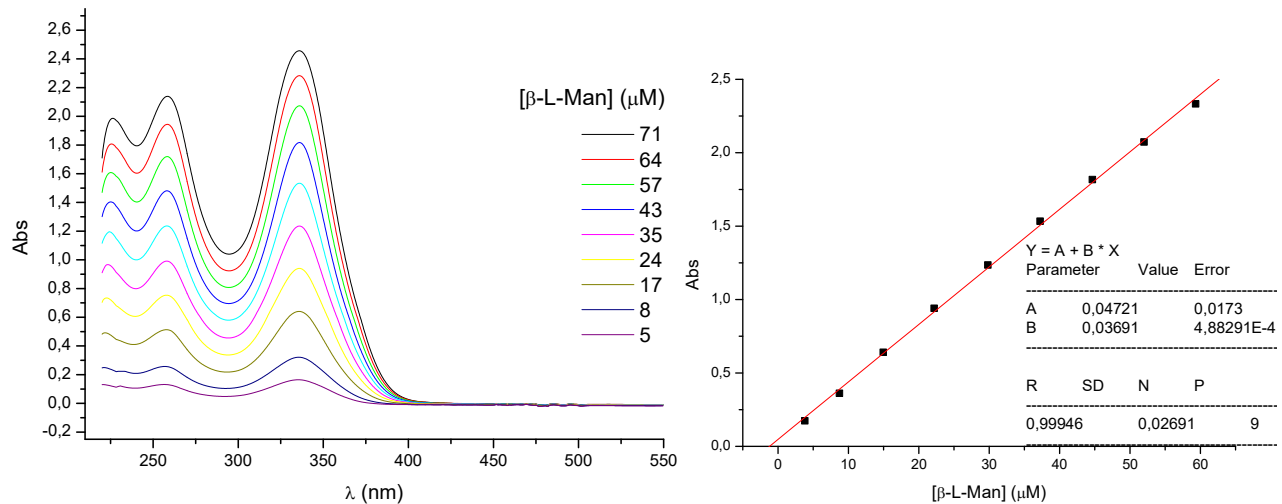
Experimentos de dilución por UV

Experimentos realizados en agua a 25°C y su ajuste a la ecuación de una recta para $\lambda = 336 \text{ nm}$

Bis(benzimidazol)- β -D-Manosa (3)



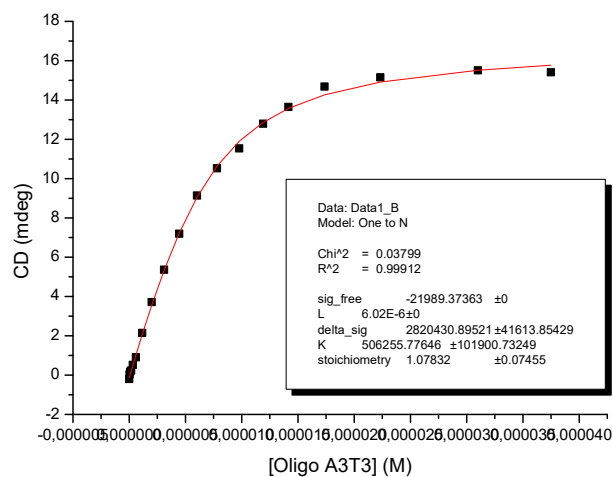
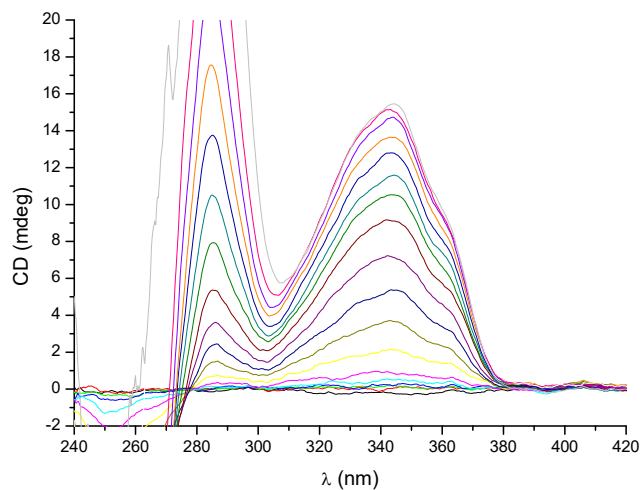
Bis(benzimidazol)- β -L-Manosa (4)



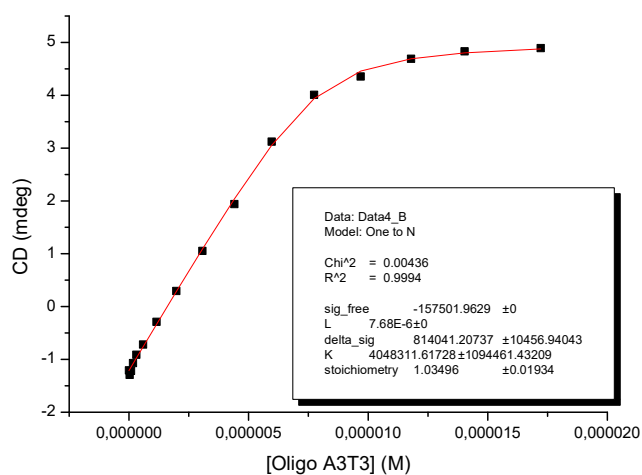
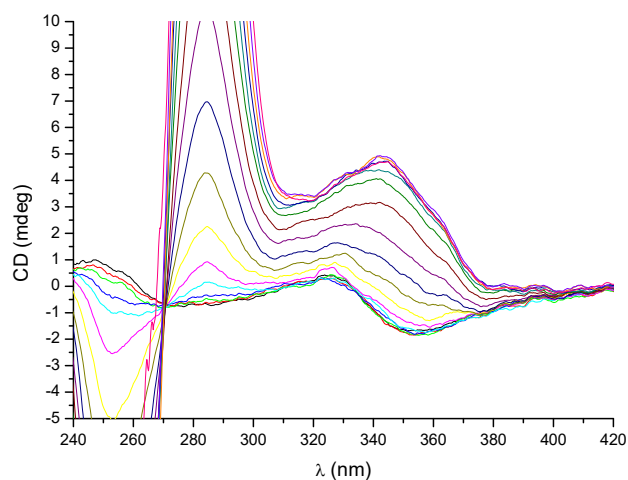
Valoraciones de los derivados 1 - 3 con el oligonucleótido A₃T₃

Experimentos realizados en tampón MOPS 25 mM, pH = 7.05, [NaCl] 200 mM) a 20 °C a una concentración de ligando de 8 μM.

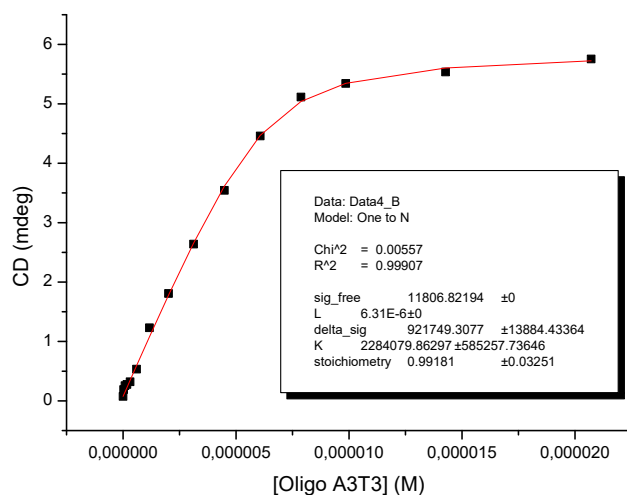
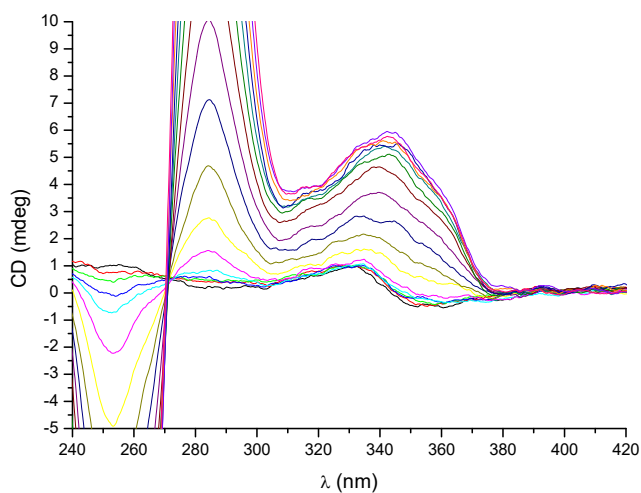
Bis(benzimidazol)-Ciclohexilo (1)



Bis(benzimidazol)-β-D-Glucosa (2)



Bis(benzimidazol)-β-D-Manosa (3)

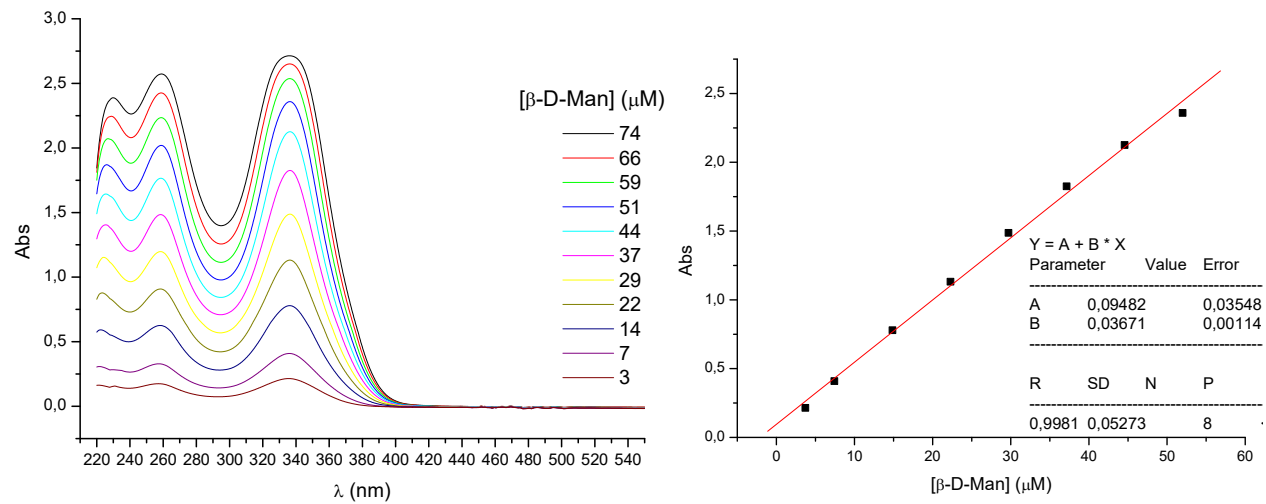


Anexo Capítulo 3

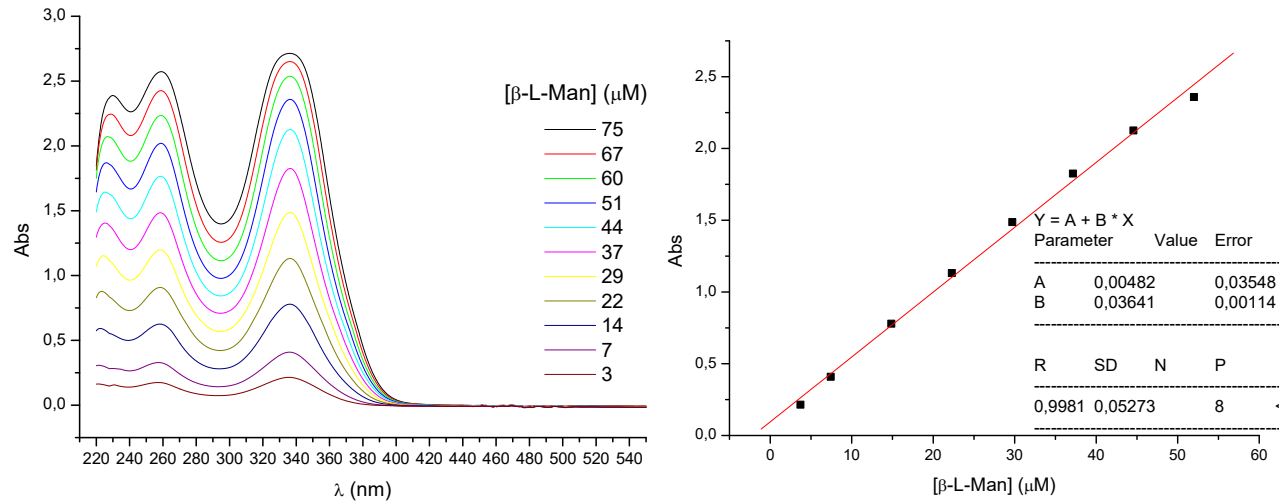
Experimentos de dilución por UV

Experimentos realizados en agua a 25°C y su ajuste a la ecuación de una recta para $\lambda = 336 \text{ nm}$

Bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Manosa (7)



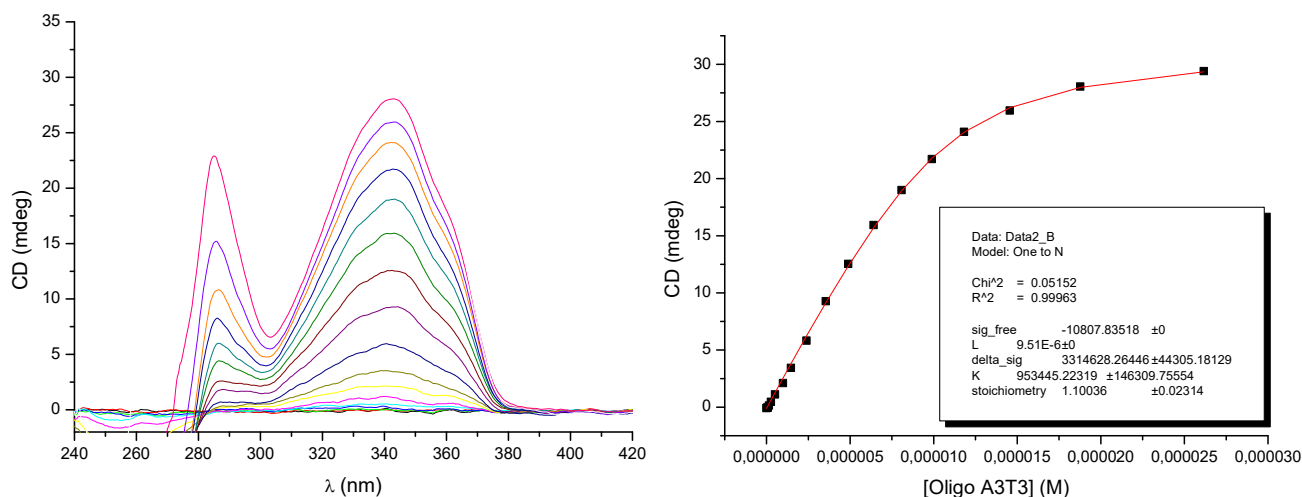
Bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Manosa (9)



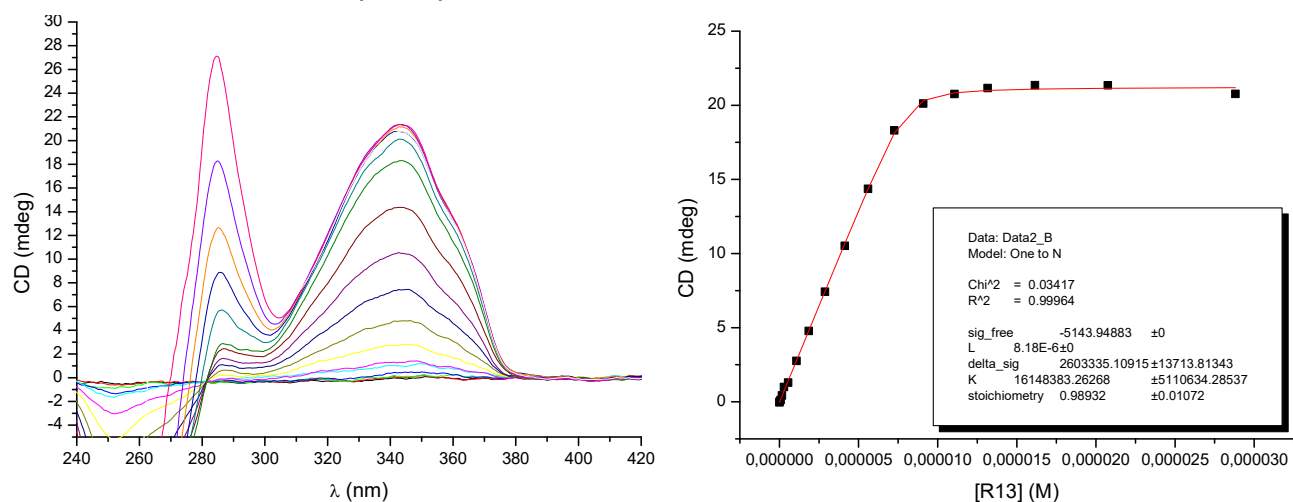
Valoraciones de los derivados 5 - 9 con el oligonucleótido A₃T₃

Experimentos realizados en tampón MOPS 25 mM, pH = 7.05, [NaCl] 200 mM) a 20 °C a una concentración de ligando de 8 μ M.

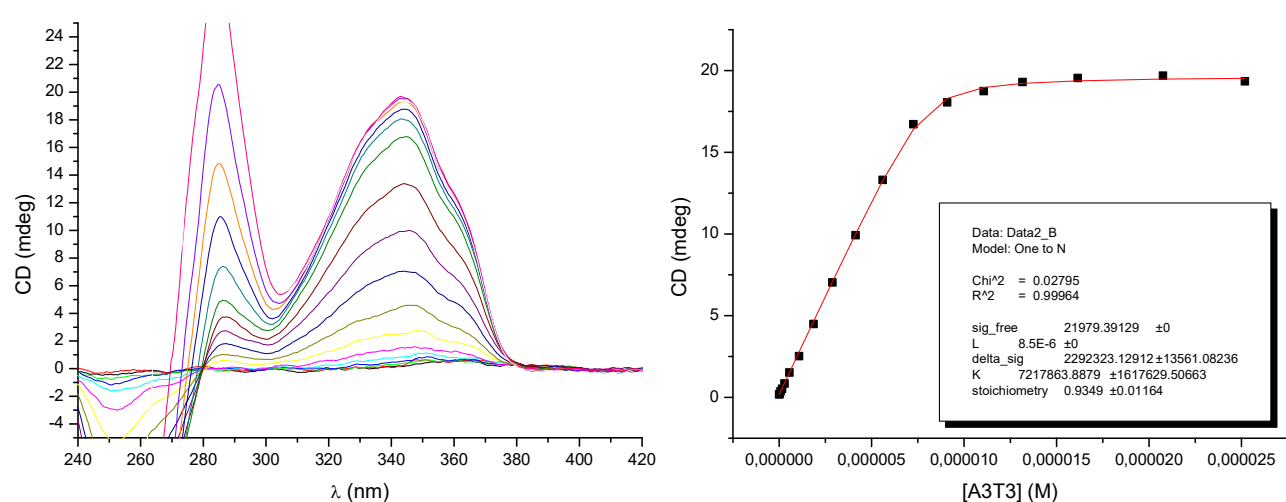
Bis(benzimidazol)- β -Ala-Ciclohexilo (5)

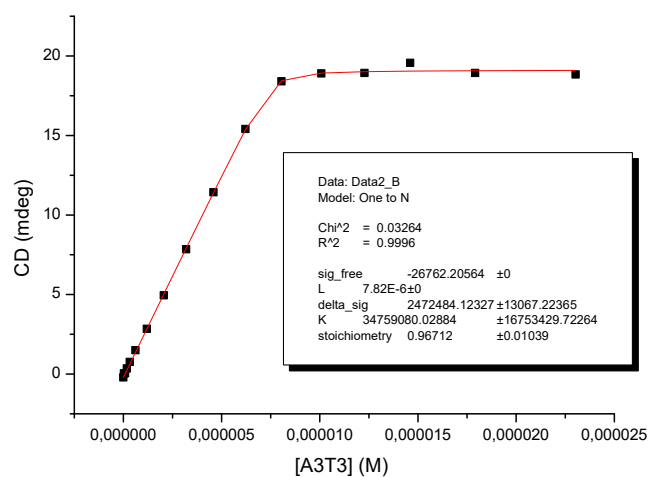
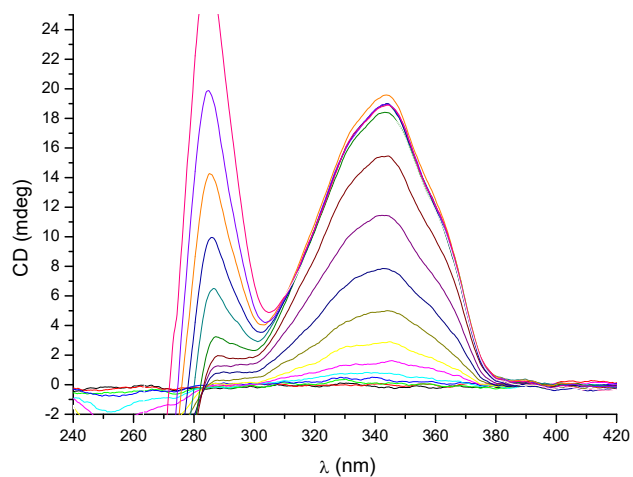
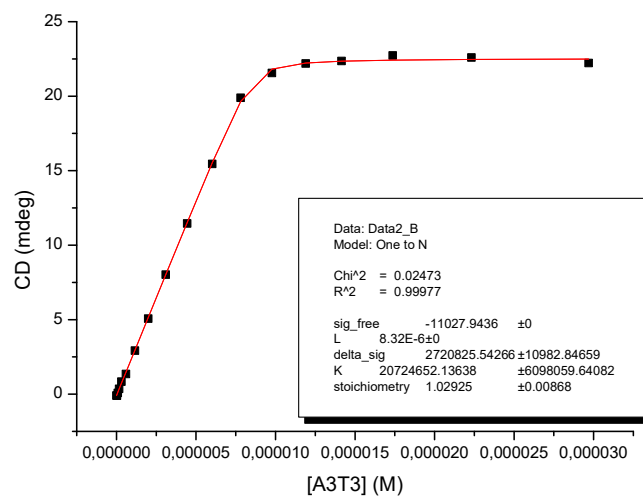
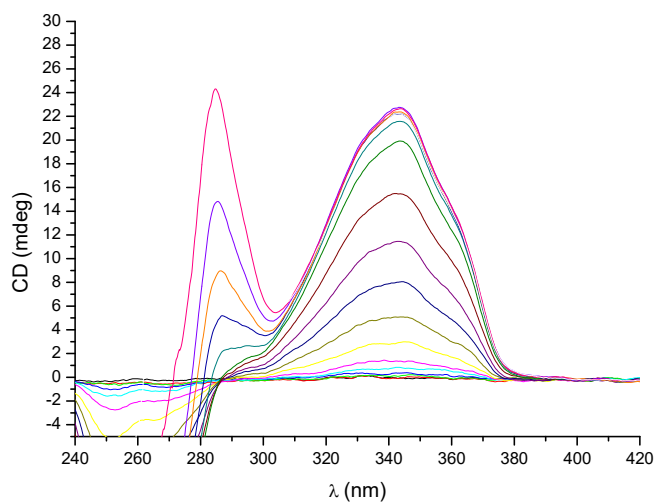


Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glucosa (6)



Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa (7)



Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Glucosa (**8**)Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Manosa (**9**)

Anexo Capítulo 4

Desplazamiento químico en ppm de cada protón del oligonucleótido A₂T₂ en D₂O, 25°C, tampón imidazol-*d*₄, empleando TSP como referencia.

Asignación parcial del complejo bis(benzimidazol)-β-Ala-β-L-Manosa (**9**) - A₂T₂

Hebra A

	H8	H6	H5	CH ₃	H1'	H2''	H2'
A5	8.27	-	-	-	6.26	3.13	2.73
A6	8.25		-	-	6.11	-	-
T7	-	6.90	-	1.29	5.16	2.02	-
T8	-	6.89	-	1.39	4.90	-	-
C9	-	6.95	5.37	-	-	-	-

Hebra B

	H8	H6	H5	CH ₃	H1'	H2''	H2'
G4	-	-	-	-	5.55	2.72	-
A5	8.17	-	-	-	6.06	2.89	-
A6	8.06	-	-	-	5.36	2.16	2.46
T7	-	6.82	-	1.16	5.14	2.02	-
T8	6.94	-	-	1.34	4.96	-	-
C9	-	7.40	5.40	-	5.65	2.38	2.17
G10	7.89	-	-	-	5.98	2.69	-
C11	-	7.27	5.37	-	5.69	2.29	1.88

Asignación del complejo bis(benzimidazol)-β-Ala-β-D-Manosa-¹³C₆ (**10**) - A₂T₂

Hebra A

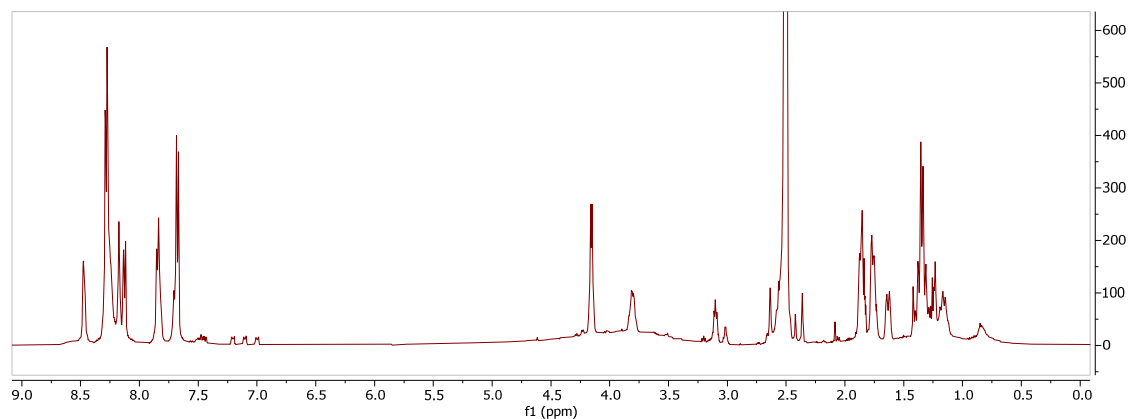
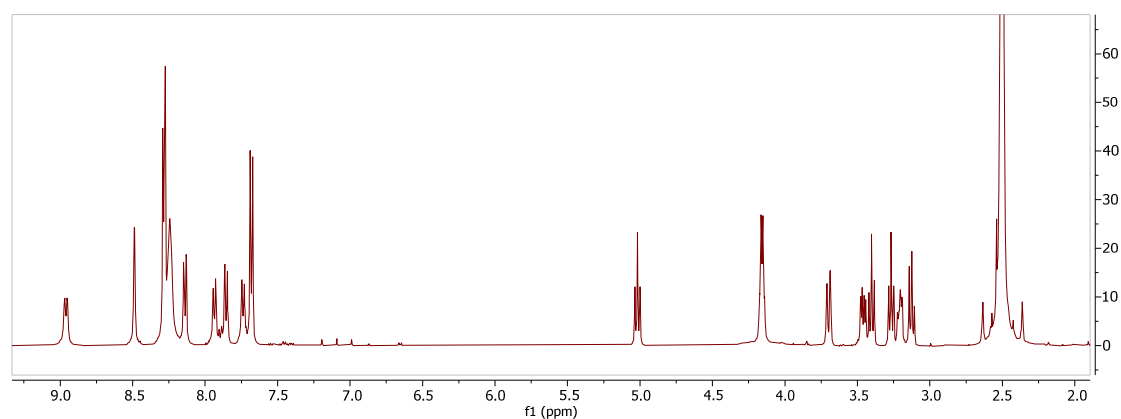
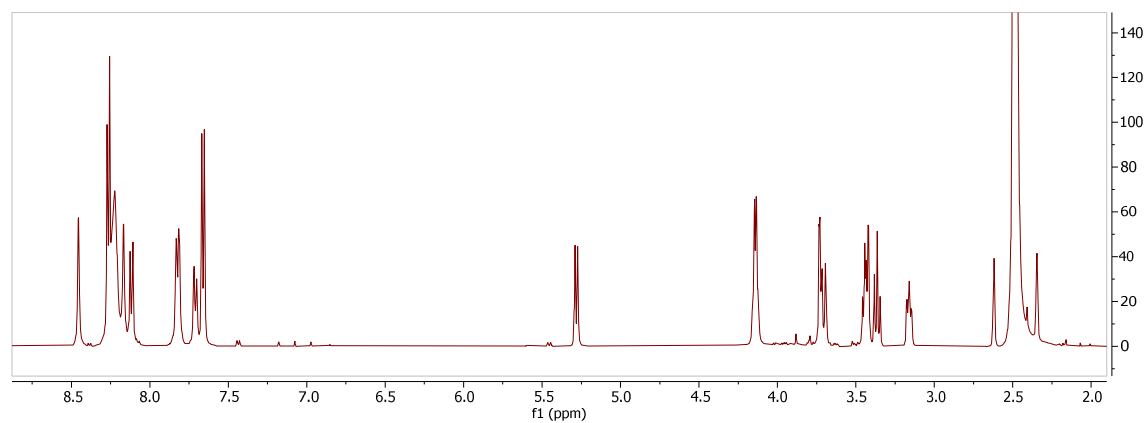
	H8	H6	H5	CH ₃	H1'
C1	-	7.68	5.87	-	5.76
G2	7.94	-	-	-	5.92
C3	-	7.19	5.36	-	5.65
G4	7.86	-	-	-	5.18
A5	8.25	-	-	-	6.06
A6	8.27	-	-	-	6.15
T7	-	6.88	-	1.35	5.16
T8	-	6.88	-	1.40	5.16
C9	-	6.96	5.37	-	5.43
G10	7.87	-	-	-	5.76
C11	-	7.37	5.46	-	5.86
G12	7.96	-	-	-	6.16

Hebra B

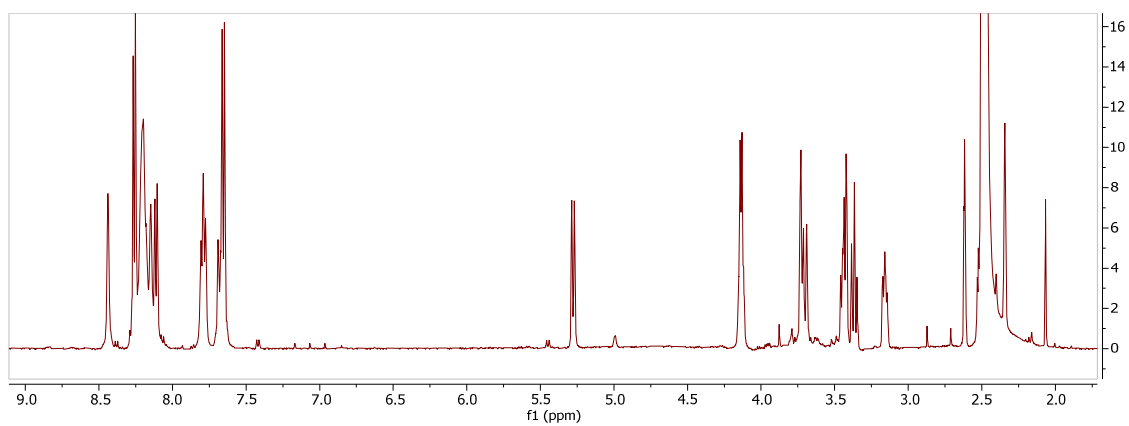
	H8	H6	H5	CH ₃	H1'
C1	-	7.63	5.88	-	5.77
G2	7.94	-	-	-	5.91
C3	-	7.22	5.38	-	5.62
G4	7.86	-	-	-	5.54
A5	8.19	-	-	-	6.08
A6	8.07	-	-	-	5.41
T7	-	6.83	-	1.16	5.17
T8	-	6.91	-	1.36	4.85
C9	-	7.12	5.86	-	5.86
G10	7.87	-	-	-	5.75
C11	-	7.38	5.47	-	5.81
G12	7.69	-	-	-	6.16

Anexo Capítulo 5

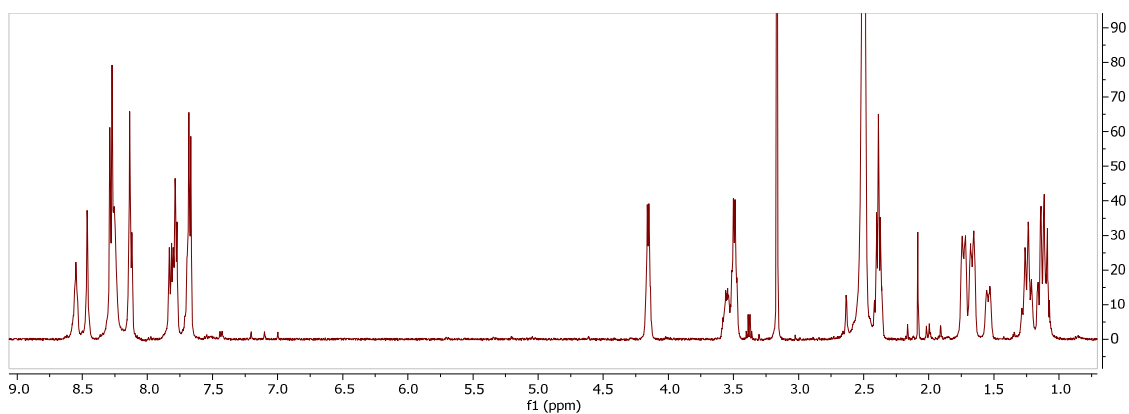
Espectros de ^1H -RMN de los ligandos finales (**1** - **10**) en $\text{DMSO}-d_6$

Bis(benzimidazol)-Ciclohexilo (1)**Bis(benzimidazol)- β -D-Glucosa (2)****Bis(benzimidazol)- β -D-Manosa (3)**

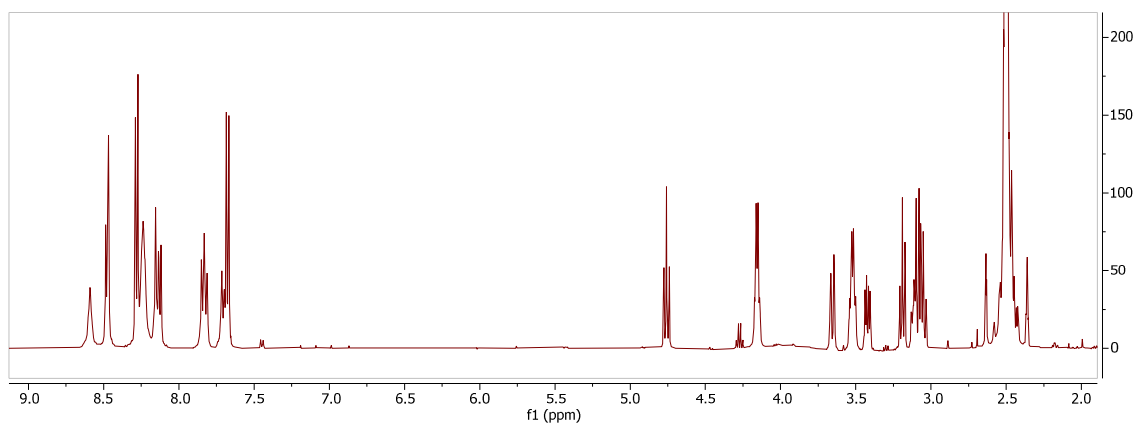
Bis(benzimidazol)- β -L-Manosa (4)

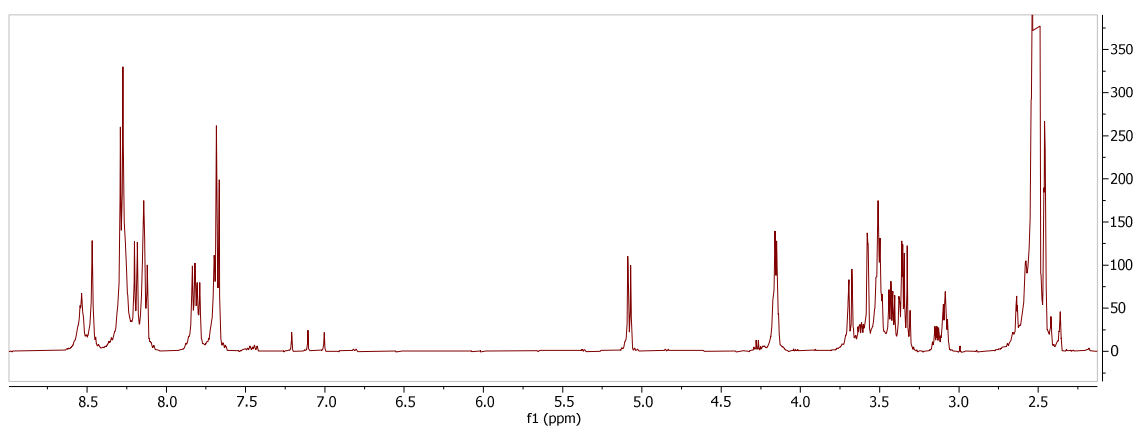
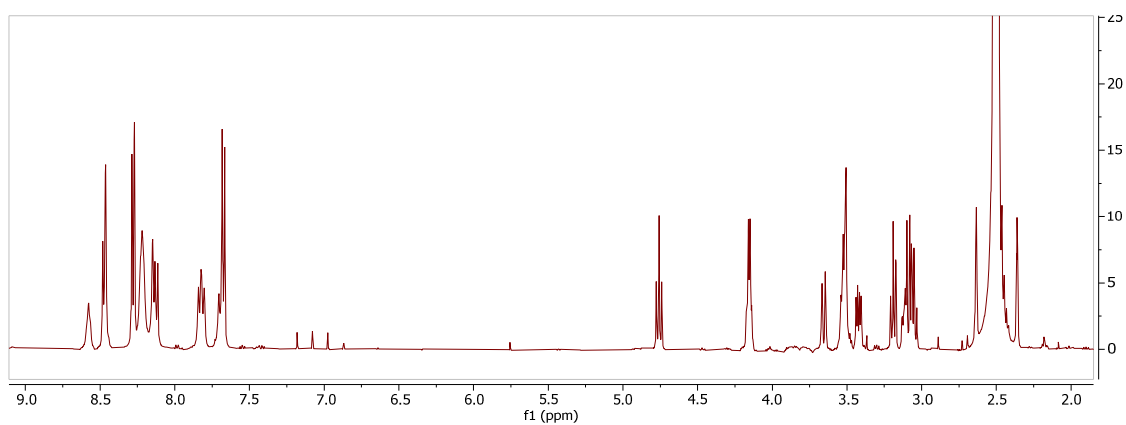
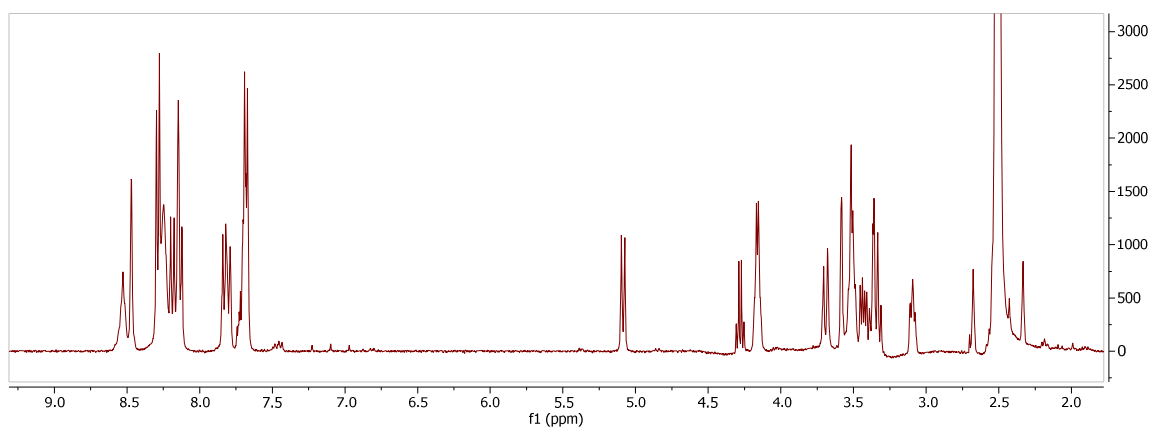


Bis(benzimidazol)- β -Ala-Ciclohexilo (5)



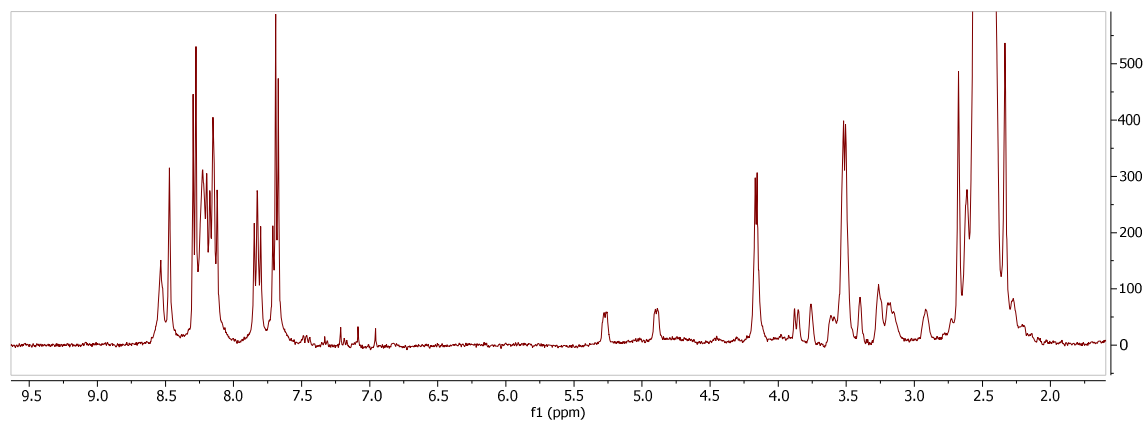
Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Glucosa (6)



Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa (7)**Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Glucosa (8)****Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -L-Manosa (9)**

Bis(benzimidazol)- β -Ala- β -D-Manosa- $^{13}\text{C}_6$ (**10**)

^1H -RMN



^{13}C -RMN

